

**Universidad Autónoma de Madrid**

Departamento de Bioquímica

**Mecanismos moleculares de  
la incorporación de la histona centromérica  
CENP-A**

TESIS DOCTORAL

Patricia Sánchez Salomón

Madrid, 2011  
Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Mecanismos moleculares de  
la incorporación de la histona centromérica  
CENP-A**

Memoria presentada por Patricia Sánchez Salomón, Licenciada en Bioquímica, para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

El trabajo presentado en esta tesis ha sido realizado en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) bajo la dirección de la Dra. Ana Losada Valiente. Para su realización se contó con una beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Ciencia e Innovación.



## AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar, me gustaría agradecer a Ana su confianza desde el comienzo de esta tesis. Durante todo este tiempo ha sabido transmitirme su conocimiento y su gran interés por este campo, lo cual ha contribuido en gran medida al desarrollo de esta tesis. Valoro mucho su crítica, su interés por mi formación y su apoyo en los momentos difíciles en los que de repente nada funciona.

Por supuesto, doy las gracias a todos mis compañeros, los Dinámicos y los Replicantes, pasados y presentes, por crear un fantástico ambiente de trabajo y por compartir muy buenos momentos dentro y fuera del laboratorio. Con ellos todo ha resultado mucho más fácil. Me gustaría agradecer especialmente a Rafa y a Teresa que me enseñaran a trabajar con el sistema de *Xenopus*, compartir con ellos tantos “días de huevos” hasta las tantas fue un verdadero placer.

También me gustaría dar las gracias a mis primeros compañeros del laboratorio de Tecnología de Proteínas y Proteómica por su acogida cuando llegué al CNIO recién salida de la Facultad, porque me enseñaron muchísimo tanto a nivel profesional como personal y porque gracias a su apoyo decidí comenzar esta tesis.

A mis amigas Sonia, Olaiz, Maite, Nat, Patri... que a pesar de la distancia han estado siempre ahí y han conseguido que, en los momentos en los que lo necesitaba, me olvidara por completo de esta tesis.

Por último, quiero dar las gracias a las personas que más han contribuido a este trabajo, mis padres, por su apoyo incondicional e Iván, por creer tanto en mí y por ser tan genial.

Muchas gracias a todos.

**A mis padres**

## **RESUMEN**

## RESUMEN:

El centrómero es una región de cromatina especializada sobre la que se ensambla el cinetocoro, una estructura multiproteica que actúa como punto de anclaje de los microtúbulos del huso mitótico. Los centrómeros están definidos epigenéticamente por la presencia de una variante de la histona H3, llamada *Centromere Protein-A* (CENP-A). Para compensar la dilución de los nucleosomas que llevan CENP-A en lugar de H3 durante la replicación del ADN, nuevos nucleosomas CENP-A se ensamblan en la cromatina del centrómero en cada ciclo de división celular. Los detalles mecánicos de este proceso a nivel molecular aún se desconocen. El trabajo que se presenta en esta tesis se centra en el estudio de la regulación espacio-temporal de la incorporación de CENP-A. Para ello se han empleado dos modelos experimentales diferentes. Por una lado, se ha desarrollado un ensayo para medir la carga de CENP-A en cromosomas ensamblados a partir de extractos de huevos de *Xenopus laevis*. Por otro, se ha establecido una línea celular humana que expresa de forma inducible una versión marcada de CENP-A. En ambos casos la incorporación de CENP-A se ha seguido mediante técnicas de inmunofluorescencia.

Nuestros resultados muestran que la incorporación de CENP-A en *Xenopus* ocurre al inicio de interfase de forma independiente a la replicación del ADN y requiere el paso previo por mitosis. La función de condensina II, un complejo implicado en la condensación cromosómica y que se acumula en la región centromérica, es necesaria tanto para la incorporación de nucleosomas CENP-A como para su retención durante interfase y mitosis. Asimismo hemos identificado y caracterizado el homólogo en *Xenopus* de HJURP, un factor necesario para la carga de CENP-A desde levaduras hasta humanos. XHJURP interacciona con la CENP-A soluble en el extracto pero no forma parte del nucleosoma centromérico final, lo que sugiere que este factor actúa como una chaperona clásica.

En células humanas, GFP-CENPA se incorpora por toda la cromatina durante la fase S pero al inicio de la siguiente fase G1 se detecta su acumulación en los centrómeros. Esta acumulación requiere la función de un complejo que contiene Mis18 $\alpha$ , Mis18 $\beta$  y M18BP1. Se ha sugerido que este complejo prepara la cromatina centromérica para la incorporación de CENP-A, y que para ello afecta el estado de acetilación de las histonas. Nosotros hemos observado que M18BP1 se asocia directamente a ARN centromérico y que su presencia en los centrómeros al final de mitosis es sensible al tratamiento con *RNase A*. Esto sugiere que la transcripción centromérica es importante para la formación/localización del complejo Mis18. Por otra parte, la reducción de los niveles celulares de Mis18 incrementa la presencia de histona H4 acetilada en la región centromérica. Mediante espectroscopía de masas hemos identificado nuevas proteínas asociadas a Mis18 que pueden ayudarnos a comprender la función y

regulación de este complejo. Entre ellas destacan condensina II y BRG1, un factor remodelador de la cromatina de la familia SWI/SNF.

## SUMMARY:

The centromere is a specialized chromosomal region that directs the formation of the kinetochore, a huge protein assembly that acts as the attachment site for spindle microtubules and carries out chromosome movement during cell division. Diverse evidences indicate that centromeres are defined by the presence of a histone H3 variant known as Centromere Protein A, CENP-A. To compensate for the dilution during DNA replication, new CENP-A nucleosomes must be assembled on chromatin in each cell cycle, but how this is achieved mechanistically is largely unknown. For this reason, we decided to study the spacio-temporal regulation of CENP-A incorporation. As experimental tools, we developed two methods: an immunofluorescence-based assay that measures CENP-A incorporation in the centromeres of chromosomes assembled in *Xenopus laevis* egg extracts and a stable cell line that expresses a tagged version of CENP-A, GFP-CENPA, in an inducible way.

We observed that CENP-A loading in *Xenopus* egg extracts occurs at interphase entry independently of DNA replication and it requires previous passage through mitosis. Performing immunodepletion and add-back experiments, we found a requirement for condensin II, a protein complex involved in mitotic chromosome structure and enriched at centromeres, in both deposition and retention of CENP-A-containing nucleosomes. Additionally, we identified and characterized *Xenopus* HJURP, a member of protein family required for CENP-A deposition from yeast to humans. XHJURP forms a complex with soluble CENP-A in the extract but it is not present at the final centromeric nucleosome, suggesting it functions as a classical chaperone.

In human cells, GFP-CENPA assembles throughout chromatin during S phase but it accumulates at centromeres by the next G1. This accumulation depends on hMis18 complex that consists of hMis18 $\alpha$ , hMis18 $\beta$  and a Myb/SANT domain-containing protein, M18BP1. Previous results suggest that Mis18 primes centromeric chromatin to allow CENP-A deposition by modifying the acetylation status of histones. We found that M18BP1 directly associates with centromeric RNA and its presence at centromeric chromatin in early G1 is sensitive to RNase A treatment. Thus, centromeric transcription could play an important role in the formation/localization of Mis18 complex. Moreover, Mis18 reduction by siRNA causes an increase in the levels of acetylated H4 at centromeres, a mark typical of transcriptionally active sites. To further understand how Mis18 complex works, we carried out a mass spec analysis of Mis18 $\alpha$  and Mis18 $\beta$  immunoprecipitates. Among the identified candidates, we found and validated the interaction of Mis18 with condensin II and the member of SWI/SNF family of chromatin remodelers BRG1.

## ÍNDICE

## ÍNDICE:

<b>1. ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
2.1 Organización de la región centromérica en diferentes organismos	5
2.2 Composición de la cromatina centromérica	7
2.3 Control temporal de la incorporación de CENP-A	11
2.4 Mecanismos de incorporación de CENP-A	13
2.5 Mecanismos adicionales que evitan la localización ectópica de CENP-A	19
2.6 Extractos de huevos de <i>Xenopus laevis</i> como sistema experimental	20
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	
<b>Parte 1. Estudio de la incorporación de CENP-A en extractos de huevos de <i>Xenopus laevis</i>.</b>	
5.1 Desarrollo de un ensayo para medir la incorporación de CENP-A	37
5.2 Control temporal de la incorporación de CENP-A	39
5.3 Papel del complejo condensina en la función del centrómero	43
5.4 Función y regulación de XHJURP	48
<b>Parte 2. Estudio de la incorporación de CENP-A en células humanas en cultivo.</b>	
5.5 Regulación espacio-temporal de la carga de CENP-A en células humanas	58
5.6 Estudio de la función del complejo hMis18 en la incorporación de CENP-A	63
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>76</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>91</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>93</b>
<b>9. ANEXO</b>	<b>102</b>

## **ABREVIATURAS**



## 1. ABREVIATURAS:

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**ARNi:** Ácido Ribonucleico interferente

**BRG1:** *Brahma-related gene-1*

**BSA:** *Bovine Serum Albumin*

**CCAN:** *Constitutive Centromeric Associated Network*

**CENP-A:** *Centromere Protein A*

**CENPs:** *Centromere Proteins*

**ChIP:** *Chromatin Immunoprecipitation*

**CREST:** Calcinosis, Raynaud's phenomenon, Esophageal dysfunction, Sclerodactyly, and Telangiectasias

**CSF:** *Cytostatic Factor*

**DAPI:** *4,6-Diamidino-2-Phenylindole*

**EDTA:** *Ethylendiaminetetraacetic Acid*

**EGTA:** *Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*

**GFP:** *Green Fluorescent Protein*

**h:** horas

**H3K9 3m:** Histona H3 metilada en la lisina 9

**H4 Ac:** Histona H4 acetilada

**HAT:** *Histone acetyltransferase*

**HDAC:** *Histone Deacetylase*

**HJURP:** *Holliday Junction Recognizing Protein*

**HSS:** *High Speed Supernatant*

**IgG:** inmunoglobulina G

**INCENP:** *Inner Centromere Protein*

**Kb:** Kilobase

**KDa:** Kilo Dalton

**LSS:** *Low Speed Supernatant*

**min:** minutos

**PBS:** *Phosphate Buffered Saline*

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*

**s:** segundos

**SDS-PAGE:** *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

**siRNA:** *Small Interference Ribonucleic Acid*

**SMARCA4:** *SWI/SNF related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4*

**SMC:** *Structural Maintenance of Chromosomes*

**SWI/SNF:** *mating-type switching and sucrose non-fermenting*

**TBS:** *Tris Buffered Saline*

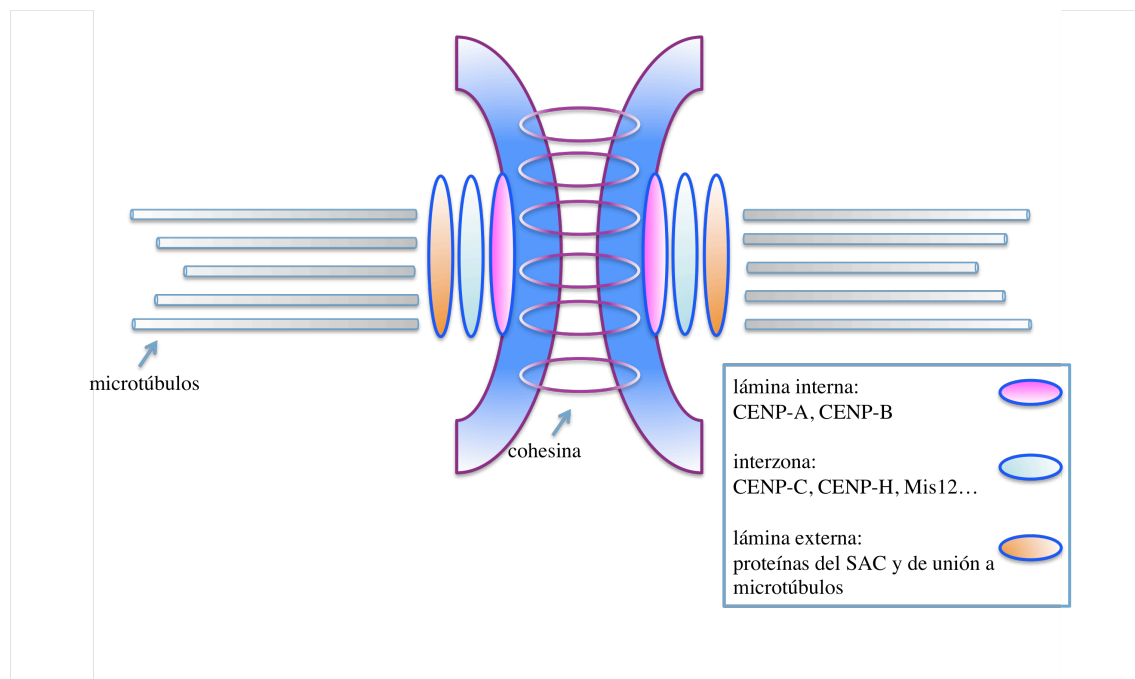
**TSA:** *Tricostatin A*

# INTRODUCCIÓN

## 2. INTRODUCCIÓN:

La mitosis es el proceso por el cual una célula se divide en dos células hijas con idéntica dotación cromosómica que la célula parental. Para que este proceso se lleve a cabo de forma correcta, la información genética contenida en los cromosomas, una vez duplicada, debe segregarse de forma equitativa a cada una de las células hijas. Por ello, la regulación de la segregación cromosómica es un aspecto fundamental de la proliferación celular. Los errores en este proceso pueden generar células aneuploides, esto es, con un número incorrecto de cromosomas. La aneuploidía es causa de muchas enfermedades congénitas y parece tener también un papel importante en el proceso de tumorigénesis (Holland et al., 2009).

El elemento central en el proceso de segregación cromosómica es el centrómero, una región de cromatina especializada presente en la constricción primaria de cada cromosoma. Esta región es la base sobre la que se construye el cinetocoro, un complejo constituido por más de un centenar de proteínas que media la interacción entre los microtúbulos del huso acromático y los cromosomas y permite el movimiento de estos últimos durante la división celular. El cinetocoro aparece bajo el microscopio electrónico como una estructura trilaminar. La lámina o cara interna está en contacto directo con la cromatina centromérica en tanto que la cara externa está compuesta por las proteínas de unión a microtúbulos y proteínas que participan en el punto de control de mitosis (o SAC, *Spindle Assembly Checkpoint*) (Figura 1).



**Figura 1. Esquema de la estructura del cinetocoro en organismos superiores.** En cromosomas mitóticos, el cinetocoro adopta una estructura trilaminar que se ensambla sobre la región centromérica. La cara o lámina interna, en contacto directo con la cromatina del centrómero, está compuesta por CENP-A y CENP-B. Proteínas necesarias para la formación del cinetocoro tales como CENP-C o Mis12 conforman la interzona y la cara o lámina externa está compuesta por proteínas de unión a microtúbulos y del punto de control de mitosis, SAC.

El SAC es uno de los mecanismos que asegura la fidelidad de la segregación cromosómica, ya que controla que no comience la separación de las dos cromátidas hasta que todos los cromosomas estén alineados en la placa metafásica, con los cinetocoros hermanos unidos a microtúbulos de polos opuestos del huso acromático (Nezi et al., 2009). El apareamiento de las cromátidas hermanas o cohesión, que implica el establecimiento de una unión física entre las dos copias de cada cromosoma resultantes de la duplicación genómica, es también esencial para impedir la separación de las cromátidas antes de tiempo y promueve la correcta disposición de los cinetocoros hermanos, facilitando así la biorientación (Losada, 2008). Por último, la condensación de los cromosomas al inicio de mitosis permite el empaquetamiento del genoma y favorece la distribución organizada y eficiente de los cromosomas a cada una de las células hijas (Hirano, 2005).

## **2.1 Organización de la región centromérica en diferentes organismos:**

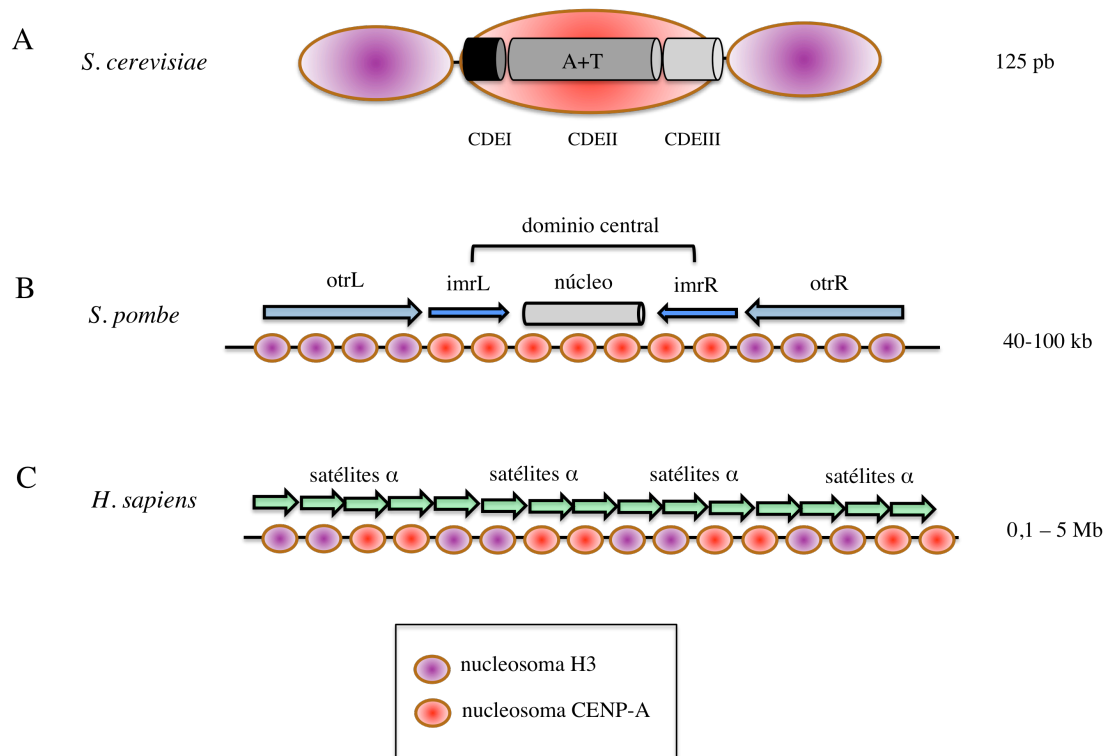
Aunque la función del centrómero está conservada en todos los tipos celulares, existe gran variedad en cuanto a su estructura y composición en los diferentes organismos. Existen dos tipos principales de centrómeros: centrómeros puntuales (*point centromeres*) y centrómeros regionales (*regional centromeres*).

Los centrómeros puntuales están presentes únicamente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y constan de una secuencia definida de ADN de 125 pares de bases (pb) con tres elementos de ADN conservados: CDEI, CDEII y CDEIII (Figura 2A). Mutaciones en cualquiera de ellos provocan defectos de segregación cromosómica, pero los efectos más evidentes se observan en cepas mutantes en CDEIII. Este elemento consiste en una secuencia consenso de 25 pb a la que se une el complejo Cbf3, esencial para la formación del cinetocoro. CDEI es una secuencia corta, de 8 pb, a la cual se une Cbf1p, un factor activador de la transcripción que interacciona con Cbf3. Entre los elementos CDEI y CDEIII se encuentra una región rica en A+T, CDEII. Este elemento interacciona con Cse4, la variante centromérica de la histona H3 que se describe más adelante. Si bien la secuencia de nucleótidos de CDEII no está conservada, su longitud es importante para la función centromérica. Estas tres regiones se organizan alrededor de un único nucleosoma que contiene Cse4 y al cual se une un único microtúbulo (Pluta et al., 1995).

Los centrómeros regionales están formados por kilobases (kb) de ADN que incluyen elementos repetidos. Un ejemplo representativo de este tipo de centrómeros se encuentra en la levadura *Schyzosaccharomyces pombe* (Figura 2B). Los tres centrómeros de *S. pombe* tienen entre 40-100 kilobases (kb) y están constituidos por un núcleo central (*core*) flanqueado por secuencias invertidas (*imrL* y *imrR*), a su vez rodeadas por otro tipo de secuencias repetidas (*otrL* y *otrR*). Estas regiones son críticas para el establecimiento y mantenimiento de la función

centromérica pero su secuencia es diferente en los distintos cromosomas (Chikashige et al., 1989, Clarke et al., 1986). En organismos superiores la organización del locus centromérico es aún más compleja que en levaduras. En cromosomas humanos, esta región puede abarcar entre 0,3 y 5 Megabases (Mb) de ADN y está compuesta por secuencias de 171 pb de un ADN satélite denominado “satélite  $\alpha$ ” (Figura 2C). Estas repeticiones se pueden agrupar en dos tipos: secuencias  $\alpha$ -I, situadas en la cara exterior del cromosoma y a las cuales se une la histona centromérica CENP-A (*Centromeric Protein A*) y secuencias  $\alpha$ -II, localizadas en los dominios central e interior del centrómero, a las cuales se unen otras proteínas tales como INCENP (*Inner Centromere Protein*), Aurora B y cohesina, importantes para la regulación del funcionamiento del centrómero y la cohesión (Cleveland et al., 2003). La proteína CENP-B (*Centromere Protein B*) es la única proteína asociada a la cromatina centromérica que reconoce una secuencia de 17 pb llamada “CENP-B box” presente en la mayoría de los satélites  $\alpha$ -I, a excepción de los del cromosoma Y.

A pesar de la correlación entre la localización del centrómero y la presencia de estos satélites, los centrómeros no están determinados por una secuencia particular de ADN sino que se encuentran definidos epigenéticamente. La principal evidencia de esta afirmación viene dada por la existencia de neocentrómeros, es decir, centrómeros originados de forma ectópica en regiones de cromatina no centromérica. A pesar de la ausencia de ADN satélite en estos sitios, los neocentrómeros son capaces de ensamblar un cinetocoro funcional y de formar una constricción primaria en el cromosoma (Marshall et al., 2008, Basset et al., 2010). Además, en cromosomas dicéntricos, los dos centrómeros pueden tener secuencias de ADN similares pero sólo uno de ellos es capaz de dirigir la segregación de las cromátidas hermanas mientras que el otro permanece inactivo (Earnshaw et al., 1985, Agudo et al., 2000). La única característica que poseen en común todos los tipos de centrómeros activos es la presencia de CENP-A, una variante de la histona H3 que forma parte de los nucleosomas centroméricos en todos los organismos. Su reducción o inactivación en diferentes sistemas experimentales origina defectos de segregación y conduce, ocasionalmente, a la muerte celular. Estas evidencias sugieren que CENP-A es la marca epigenética que determina la identidad centromérica (Stoler et al., 1995, Howman et al., 2000, Blower et al., 2001, Reigner et al., 2005).



**Figura 2. Esquema de la organización de los centrómeros en diferentes organismos.** (A) El centrómero de *S. cerevisiae* está compuesto por tres elementos conservados: CDEI, CDEII y CDEIII que ocupan una extensión de 125 pb. CDEII es rico en nucleótidos adenina y timidina y es la región de unión del nucleosoma CENP-A. (B) Los tres centrómeros de *S. pombe* contienen entre 40-100 kb y están formados por un núcleo central flanqueado a ambos lados por dos tipos de secuencias repetidas (imr y otr). (C) En cromosomas humanos, la región centromérica abarca entre 0,1-5 Mb y está compuesta por secuencias repetidas de 171 pb denominadas: satélites  $\alpha$ .

## 2.2 Composición de la cromatina centromérica:

La cromatina del centrómero no está compuesta exclusivamente por nucleosomas CENP-A, sino que éstos se alternan con nucleosomas que contienen la histona H3. Se han propuesto diferentes modelos para explicar la disposición de ambos tipos de nucleosomas en la cromatina del centrómero. Uno de ellos sugiere que, durante la mitosis, las regiones que contienen cada tipo de nucleosoma se separan espacialmente de forma que los nucleosomas que contienen CENP-A se orientan hacia la cara externa del centrómero y los que contienen H3 hacia la cara interna (Blower et al., 2002, Marshall et al., 2008). Otro modelo propone que los nucleosomas CENP-A y H3 se disponen alternativamente formando una estructura de tipo senoide (Ribeiro et al., 2010). En cualquier caso, la organización tridimensional que adopta la cromatina centromérica es importante para la formación del cinetocoro.

### **Características estructurales de CENP-A.**

CENP-A es una proteína de 17 KDa cuya secuencia posee una homología del 60% con la histona H3. Esta homología está restringida al dominio C-terminal de H3 e incluye el dominio de plegamiento de histonas (*histone fold domain*, HFD) (Palmer et al., 1987). El dominio N-terminal de CENP-A posee la flexibilidad típica de las colas de las histonas, pero su secuencia de aminoácidos no se parece a la de H3 ni a la de ninguna otra variante de histonas. Además, tanto su longitud como su secuencia de aminoácidos es muy variable entre diferentes organismos (Henikoff et al., 2005). Sin embargo, en células de *Drosophila* se ha identificado un dominio rico en argininas muy conservado en levaduras y humanos. Este dominio es necesario para el reclutamiento de BubRI, una proteína del punto de control de mitosis (o SAC, *Spindle Assembly Checkpoint*) (Torras-Llort et al., 2010).

Experimentos clásicos de intercambio de dominios entre H3 y CENP-A mostraban que el HFD de CENP-A era el elemento estructural responsable de la localización específica de CENP-A en el centrómero (Sullivan et al., 1994). Igualmente, la localización de Cse4 en *S. cerevisiae* depende de esta región (Morey et al., 2004). Más recientemente se ha visto que los nucleosomas CENP-A poseen una conformación más rígida que los nucleosomas H3 (Black et al., 2007). El dominio que confiere esta característica consiste en la hélice 2 y el lazo L1 del HFD y representa la superficie de interacción entre CENP-A y H4. Nucleosomas H3 en los que este dominio de CENP-A sustituye al correspondiente en H3 se depositan exclusivamente en la cromatina centromérica, por lo que esta región se ha denominado CATD (*centromeric targeting domain*) (Black et al., 2004, Black et al., 2007). Estos resultados indican que el CATD no sólo dirige la asociación de CENP-A a la cromatina centromérica sino que también crea una singularidad estructural en el nucleosoma que seguramente facilita su reconocimiento por factores específicos y, de esta forma, propaga la marca epigenética de una generación a la siguiente (Chou et al., 2011, Zhou et al., 2011, Sekulic et al., 2010).

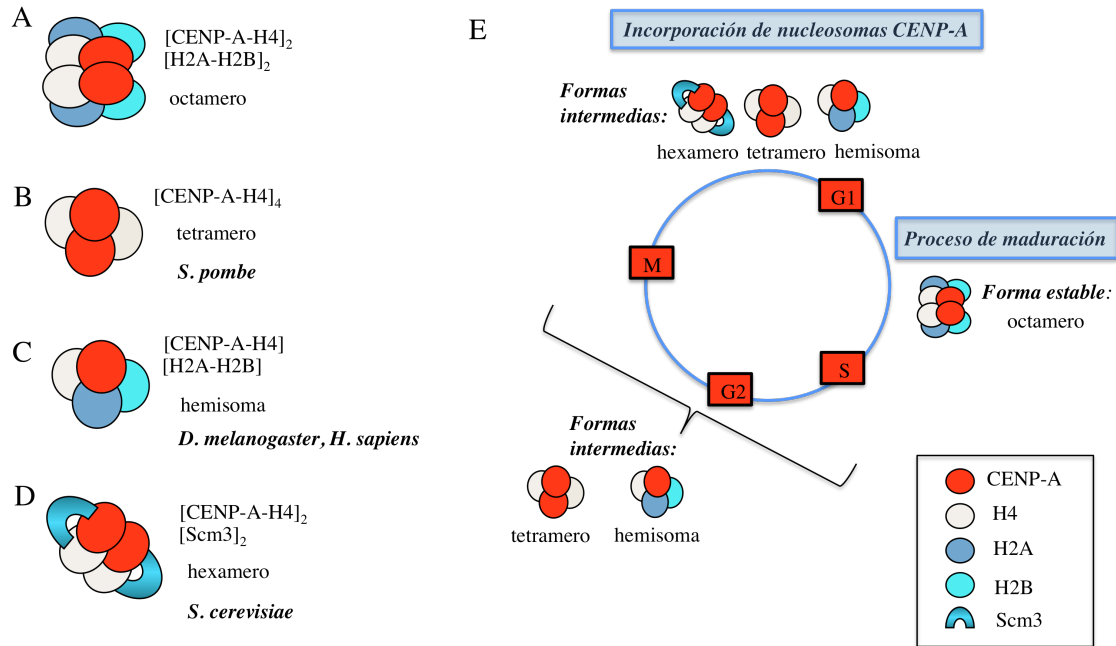
### **Composición de los nucleosomas que contienen CENP-A.**

La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma. De forma general, los nucleosomas están compuestos por un fragmento de ADN de 146 pb que se enrolla alrededor de un octámero de histonas formado por un tetrámero de H3-H4 y dos dímeros de H2A-H2B. Sin embargo, la composición de los nucleosomas que contienen CENP-A no está clara. El modelo más aceptado propone que CENP-A forma octámeros homotípicos en los que las dos moléculas de H3 son sustituidas por CENP-A (Shelby et al., 1997, Foltz et al., 2006, Camahort et al., 2009, Sekulic et al., 2010, Kingston et al., 2011) (Figura 3A). Por el contrario, varios estudios de microscopía de fuerza atómica en *Drosophila* y células humanas muestran que las dimensiones del nucleosoma



CENP-A son exactamente la mitad de las correspondientes a un octámero de histonas, sugiriendo que CENP-A forma hemisomas en asociación con H2A, H2B y H4 (Figura 3B). Aunque estas formas pueden ser el resultado de la disociación de los octámeros debido a diferentes fuerzas físicas, tales como la replicación del ADN o la mitosis, es posible también que existan en la célula factores que depositen nucleosomas CENP-A en forma de tetrámeros (Dalal et al., 2007, Dimitriadis et al., 2010). En el caso de *S. cerevisiae*, se ha propuesto que Scm3, una proteína no perteneciente al grupo de las histonas, reemplaza al dímero H2A-H2B formándose así un hexasoma (Mizuguchi et al., 2007, Stoler et al., 2007) (Figura 3C). Sin embargo, este modelo es contrario a lo propuesto en otros estudios en los que se muestra que Scm3 es capaz de inducir el ensamblaje de nucleosomas CENP-A *in vitro* sólo en presencia de H2A-H2B (Camahort et al., 2007, Kingston et al., 2011 Shivaraju et al., 2011). En *S. pombe*, se el nucleosoma centromérico parece estar formado únicamente por un tetrámero de CENP-A y H4 (Williams et al., 2009) (Figura 3D).

Por otro lado, el sentido del enrollamiento del ADN alrededor de las histonas del centrómero, positivo (hacia la derecha) o negativo (hacia la izquierda), no está claro. Ensayos de ensamblaje de nucleosomas CENP-A *in vitro* muestran que el ADN se enrolla de forma positiva, contrariamente a lo que ocurre en los nucleosomas H3 (Furuyama et al., 2009, Wu et al., 2007). Se ha propuesto que esta singularidad puede ser un rasgo de diferenciación adicional de los nucleosomas centroméricos. Sin embargo, análisis topológicos y bioquímicos posteriores indican que el ADN se enrolla alrededor de los nucleosomas CENP-A de forma convencional, es decir, hacia la izquierda (Sekulic et al., 2010, Kingston et al., 2011). Para tratar de conciliar esta disparidad de resultados se ha propuesto un modelo según el cual la composición de los nucleosomas CENP-A podría variar a lo largo del ciclo celular. Los nucleosomas ya depositados en la cromatina centromérica, denominados “maduros”, formarían octámeros homotípicos con enrollamiento negativo. Sin embargo, durante la replicación del ADN y la mitosis, los nucleosomas podrían adoptar formas “intermedias” dando lugar a tetrámeros, hexasomas o hemisomas (Black et al., 2011) (Figura 3E).



**Figura 3. Esquema de los diferentes tipos de nucleosomas CENP-A.** Los nucleosomas que contienen CENP-A pueden formar octámeros en los que CENP-A reemplaza a H3 (A). En *S. pombe* se ha propuesto la presencia de tetrámeros, en los que sólo CENP-A y H4 formarían el nucleosoma centromérico (B). En *Drosophila* y humanos, se han detectado hemisomas, es decir, tetrameros compuestos por un dímero de CENP-A/H4 y uno de H2A/H2B (C). En *S. cerevisiae*, Scm3, una proteína no histona, reemplazaría a H2A/H2B formando hexámeros (D). Recientemente, se ha propuesto que los nucleosomas CENP-A varían en su composición a lo largo del ciclo celular, adquiriendo formas estables e intermedias (E).

### Modificaciones de histonas en la región centromérica.

En términos muy generales, existen dos tipos de cromatina: la eucromatina, transcripcionalmente activa, y la heterocromatina o cromatina silenciada. Cada una de ellas lleva asociada una serie de modificaciones postraduccionales en los dominios N-terminales de las histonas. La cromatina centromérica posee un patrón de modificación de histonas que difiere tanto de la eucromatina como de la heterocromatina. El análisis de inmunofluorescencia de fibras de cromatina de células humanas y de *Drosophila* muestra que los nucleosomas H3 intercalados en la cromatina que contiene CENP-A están dimetilados en su lisina 4 (H3K4me2), siendo esta modificación típica de regiones de eucromatina. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en eucromatina, las histonas H3 y H4 no están acetiladas. También está ausente la trimetilación en la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3), una modificación característica de la heterocromatina (Sullivan et al., 2004). Esta combinación única de modificaciones postraduccionales puede ser importante para el mantenimiento de la región centromérica ya que por un lado facilitaría la deposición de CENP-A y por el otro, evitaría su propagación fuera del centrómero. De hecho, CENP-A, cuando es sobreexpresada en células S2 de *Drosophila*, se incorpora preferentemente en las regiones de intersección entre eucromatina y heterocromatina,

dando lugar a la formación de cinetocoros ectópicos (Olszak et al., 2011). En *S. cerevisiae*, la presencia de CENP-A tanto en centrómero como en sitios ectópicos, está asociada a la hipacetilación de H4K16 y el mantenimiento de esta marca es necesario para la función del cinetocoro (Choy et al., 2011). Además, la actividad de la deacetilasa de histonas Gen5 sobre la cromatina centromérica es importante para una correcta segregación cromosómica (Vernarecci et al., 2008). Por último, cabe señalar que la única modificación identificada hasta el momento en la propia CENP-A es la fosforilación de la serina 7 en células humanas mediada por la quinasa Aurora B. Esta modificación ocurre en mitosis y parece ser importante para el proceso de citocinesis (Zeitlin et al., 2001).

Clásicamente, la región centromérica se ha considerado un dominio transcripcionalmente inactivo. Sin embargo, las secuencias repetidas presentes en la parte externa del centrómero de *S. pombe* se transcriben, se procesan por la maquinaria de ARN interferente y dan lugar a ARNs pequeños (*siRNAs*) que participan en el establecimiento de la heterocromatina pericentromérica y la cohesión (Grewall, 2010). También se han identificado transcritos no codificantes derivados del núcleo central (*core*) pero su función aún se desconoce (Choi et al., 2011). En organismos superiores, incluyendo plantas, se han visto ARNs asociados a las repeticiones centroméricas (Nakano et al., 2003, Topp et al., 2004, Du et al., 2010). En células de ratón, estos transcritos no codificantes se asocian a Aurora B y potencian su actividad quinasa (Ferri et al., 2009). Además, su acumulación en situaciones de estrés o diferenciación afecta a la estructura centromérica y origina defectos de segregación (Bouzinba-Segard et al., 2006). En células humanas, varios componentes del centrómero se asocian directamente a estos ARNs derivados del ADN satélite en el nucleólo y se ha propuesto que desde allí se dirigirían al centrómero (Wong et al., 2007). La transcripción centromérica podría estar también implicada en el mecanismo de incorporación de CENP-A. Se ha observado que la eliminación de H3K4me2 en el centrómero de un cromosoma artificial humano (*human artificial chromosome*, HAC) conlleva la disminución de la transcripción en esta región y reduce la incorporación de CENP-A (Bergmann et al., 2010).

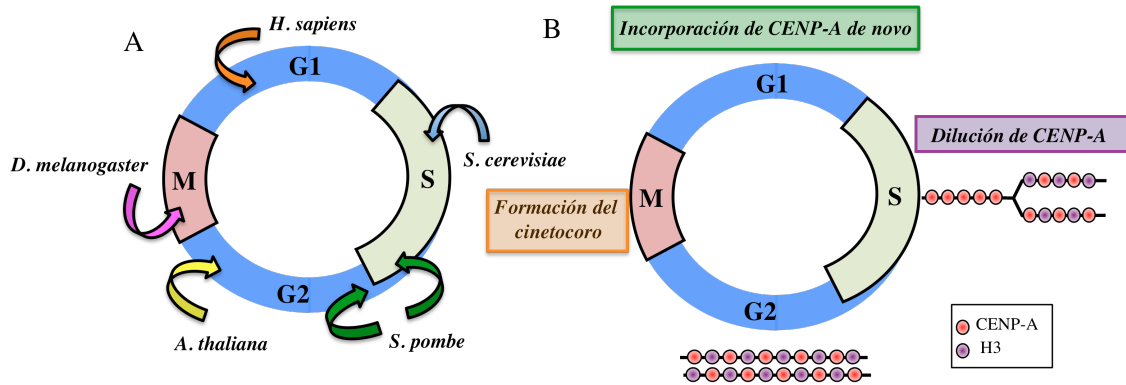
### **2.3 Control temporal de la incorporación de CENP-A:**

El mantenimiento de la identidad centromérica requiere que se depositen nuevos nucleosomas CENP-A en la cromatina centromérica en cada división celular. El momento del ciclo celular en que esto ocurre varía entre diferentes organismos (Figura 4A). En *S. cerevisiae*, experimentos de FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) muestran que se incorporan nuevos nucleosomas CENP-A en las dos cromátidas durante la replicación del ADN en fase S (Pearson et al., 2004). En *S. pombe*, la incorporación ocurre en dos fases, S y G2 (Takayama et al., 2008). La primera depende del factor de transcripción de genes de histonas, Ams2. Aún en ausencia de

este factor, al final de G2 se produce una nueva incorporación de CENP-A a cromatina, lo cual sugiere que la incorporación en fase G2 podría ser un mecanismo de rescate para asegurar el mantenimiento de la identidad centromérica.

En *Arabidopsis thaliana*, la carga de CENP-A tiene lugar durante la fase G2 y es independiente de replicación (Lermontova et al., 2006). Experimentos de FRAP en embriones tempranos de *Drosophila melanogaster* muestran que señal de CENP-A en los centrómeros se recupera únicamente a final de mitosis, durante anafase, coincidiendo con un aumento en los niveles totales de CENP-A en el centrómero (Schuh et al., 2007). Sin embargo, el momento de dicha incorporación parece variar según el estadio del desarrollo en *Drosophila*, ya que ensayos en células en cultivo indican que el depósito de nueva CENP-A tiene lugar durante metafase (Ahmad et al., 2001, Mellone et al., 2011).

En humanos, la incorporación de CENP-A es independiente de replicación ya que el tratamiento de células con afidicolina, una droga que inhibe las ADN polimerasas replicativas, no afecta a los niveles de CENP-A en el centrómero (Shelby et al., 2000). Así, durante la fase S, los nucleosomas de CENP-A se distribuyen a cada una de las hebras resultantes de la replicación y en su lugar se incorporan nucleosomas H3, probablemente conteniendo la variante de histona H3.3 (Dunleavy et al., 2011). El desarrollo de técnicas específicas de marcaje tales como el SNAP-tag ha permitido visualizar específicamente la fracción de CENP-A de nueva síntesis y seguir su dinámica de incorporación a la cromatina centromérica. Empleando este sistema se ha demostrado que CENP-A se incorpora en los centrómeros durante las primeras horas de fase G1 (Jansen et al., 2007). Estudios posteriores en los que se empleó la técnica de FRAP han confirmado este resultado (Hemmerich et al., 2008). Además, experimentos de fusión de células en distintas fases del ciclo celular sugieren que el paso a través de mitosis es un requisito para la entrada de nueva CENP-A en la cromatina centromérica en G1 (Jansen et al., 2007). Sin embargo, aún no se conoce la razón molecular de dicho requisito. Una consecuencia de que la incorporación de nueva CENP-A tenga lugar en G1 es que durante mitosis, el momento en que se completa el ensamblaje del cinetocoro para llevar a cabo su función, la cromatina centromérica tiene sólo la mitad de los nucleosomas CENP A con que cuenta en otros momentos del ciclo celular (Figura 4B). Esta configuración de la cromatina centromérica podría ser importante para su función y su propagación.



**Figura 4. Esquema que indica el momento de incorporación de CENP-A en distintos organismos.** (A) En *S. cerevisiae* la incorporación de CENP-A está acoplada a la replicación del ADN en fase S. En *S. pombe*, existen dos momentos de incorporación, durante S y G2. Mientras que en *A. thaliana* CENP-A se deposita en fase G2, en *Drosophila* lo hace durante mitosis. En células humanas, la incorporación de CENP-A ocurre al inicio de G1. (B) En humanos, durante fase S, los nucleosomas CENP-A se reparten entre las dos hebras resultantes de la replicación del ADN. Por esto, la célula avanza durante G2 y mitosis con la mitad del contenido total de CENP-A en cromatina, hasta su incorporación *de novo* al comienzo de G1.

## 2.4 Mecanismos de incorporación de CENP-A:

### Factores que depositan otras variantes de H3.

Las histonas se puede clasificar en dos grupos diferentes: histonas replicativas o canónicas e histonas de reemplazamiento. Las histonas H4, H2A, H2B y las variantes de H3 denominadas H3.1 y H3.2 pertenecen al primer grupo. Su síntesis ocurre durante la fase S con el fin de proveer material para el ensamblaje de nucleosomas *de novo* durante la replicación del ADN. H3.1 y H3.2 son casi idénticas, pues su secuencia varía en un único aminoácido. Mientras que H3.2 es el producto de un único gen, H3.1 se expresa a partir de diez genes diferentes y es la más abundante (Franklin et al., 1977). Las otras dos variantes de H3 existentes en mamíferos, H3.3 y CENP-A forman el grupo de las histonas de reemplazamiento y se identificaron inicialmente como productos de genes cuya expresión tiene lugar fuera de fase S (Zweilder et al., 1984). H3.3 difiere de H3.1 y H3.2 en 4-5 aminoácidos y se incorpora únicamente a sitios activos transcripcionalmente (Ahmad et al., 2002).

La purificación de complejos asociados a las formas solubles de H3.1 y H3.3 mostró que cada una de estas variantes es depositada en cromatina por una maquinaria diferente (Tagami et al., 2004). CAF-1 (*Chromatin Assembly Factor 1*) se identificó exclusivamente en el complejo H3.1. Este factor se encuentra conservado a lo largo de la evolución y su función es depositar dímeros H3-H4 en cromatina durante la replicación y reparación del ADN (Smith et al., 1989). La eliminación de CAF-1 provoca defectos de desarrollo en ratón, *Xenopus* y *Drosophila* e impide la progresión de la fase S en células humanas (Corpet et al., 2009). Este

complejo formado por tres subunidades: p150, p60 y RbAp48, y se dirige a la horquilla de replicación a través de su interacción con PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), un cofactor de la ADN polimerasa. La chaperona de histonas HIRA forma parte exclusivamente del complejo H3.3, que deposita nucleosomas independientemente de la síntesis de ADN (Ray-Gallet et al., 2002). Por el contrario, las chaperonas Asf1 y NASP fueron identificadas en ambos complejos. Asf1 (*Anti-Silencing Function 1*) se une a H3-H4 en el citoplasma y promueve su transporte a través de la membrana nuclear. Recientemente, se ha mostrado que la mayor parte de H3-H4 interacciona con la chaperona NASP (*nuclear autoantigenic sperm protein*) en el citoplasma de células humanas (Campos et al., 2010). NASP es homóloga a N1/N2 de *Xenopus* y generalmente, se ha asociado con la histona H1.

### **Papel de los componentes de centrómero en el ensamblaje de CENP-A.**

A partir del análisis mediante espectrometría de masas de las proteínas que co-inmunoprecipitan con CENP-A en extractos de células humanas se han identificado numerosos factores que se asocian a la cromatina centromérica. Este grupo forma el denominado *constitutive centromeric associated network* (CCAN) compuesto por 16 proteínas llamadas CENPs. La función de la mayoría de estos elementos aún se desconoce pero su presencia en el centrómero es necesaria para una correcta segregación cromosómica. Entre los componentes del CCAN destacan CENP-N y CENP-C. CENP-N interacciona directamente con nucleosomas CENP-A, al menos *in vitro*. Se ha mostrado que CENP-C también se une a nucleosomas CENP-A *in vitro* (Carroll 2010), en tanto que *in vivo* lo hace con nucleosomas H3 (Hori 2008). CENP-C y CENP-N son necesarias para el ensamblaje del resto de componentes del CCAN. Además, la eliminación de CENP-N reduce la incorporación de nueva CENP-A en el centrómero (Carroll 2009). En *Drosophila*, CENP-C es esencial para la carga de nueva CENP-A pero este requerimiento no es extensible a otras especies (Erhardt et al., 2008). La eliminación del complejo CENP-H-I, que se une a CENP-N y forma parte del CCAN, sí provoca defectos en la carga de CENP-A.

Por otra parte, estudios recientes destacan el papel de CENP-C y el complejo CENP-T/W, otro subcomplejo dentro del CCAN, en la formación del cinetocoro (Milks et al., 2009, Hori et al., 2008). El dominio C-terminal de ambas proteínas parece asociarse a la cromatina centromérica, mientras que el dominio N-terminal establece contactos con las proteínas del exterior del cinetocoro, en concreto con el complejo Mis12 y el complejo Ndc80. Se ha propuesto que la presencia de CENP-C y CENP-T/W es suficiente para el ensamblaje de un cinetocoro funcional, al menos durante las primeras divisiones mitóticas, mientras que CENP-A es indispensable para determinar la posición en la que tiene lugar dicho ensamblaje (Screpanti et al., 2011, Przewłoka et al., 2011, Suzuki et al., 2011, Gascoigne et al., 2011).

El hecho de que ninguno de los componentes del CCAN haya sido identificado entre las proteínas que co-inmunoprecipitan con CENP-A de la fracción soluble sugiere que no son factores de carga propiamente dichos. Sin embargo, esta estructura organizada alrededor del nucleosoma CENP-A puede servir como plataforma de reconocimiento para los factores que median la incorporación de CENP-A en cromatina.

### **Chaperonas de histonas y la incorporación de CENP-A.**

Con el objetivo de identificar factores que depositen CENP-A en cromatina, se han realizado *screenings* funcionales en diferentes organismos. En *S. pombe*, la búsqueda de elementos relacionados con la integridad del cinetocoro llevó a la identificación de Sim3, una chaperona de histonas homóloga a NASP en humanos y N1/N2 en *Xenopus*. Sim3 interacciona con la fracción soluble de CENP-A y H3. Su función es necesaria para la incorporación de CENP-A pero nunca se ha detectado en el centrómero, por lo que es probable que tenga un papel indirecto. Se ha propuesto que Sim3 actúa protegiendo y facilitando la asociación de CENP-A con otro factor que medie su carga en cromatina (Dunleavy et al., 2007). Dos estudios independientes, sugieren que Scm3 es ese factor. Scm3 interacciona con la fracción soluble de CENP-A, es necesario para su acumulación centromérica y se localiza en los centrómeros durante todo el ciclo celular a excepción de mitosis (Pidoux et al., 2009, Williams et al., 2009). Esta localización es independiente de CENP-A pero requiere la presencia de Mis16 (homólogo de RbAp46/48) y Mis18, otras dos proteínas implicadas en el proceso de ensamblaje de CENP-A. En el caso de *S. cerevisiae*, Scm3 promueve la incorporación de CENP-A en cromatina a través de su unión a Ndc10, una proteína del cinetocoro que reconoce una secuencia específica de ADN, CDEIII (Westermann et al., 2007). Se ha propuesto que Scm3 forma parte del nucleosoma centromérico final, a diferencia de su homólogo en *S. pombe*.

En células humanas, dos estudios independientes identificaron HJURP (*Holliday junction recognizing protein*) formando un complejo con la forma soluble de CENP-A, pero no con H3.1 (Foltz et al., 2009, Dunleavy et al., 2009). En esta purificación aparecieron también la histona H4 y NPM1 (*nucleophosmin*). NPM1 y HJURP se habían encontrado también en los inmunoprecipitados de CENP-A a partir de cromatina centromérica, pero en cantidades muy pequeñas. HJURP se había implicado con anterioridad en el proceso de reparación de roturas de doble cadena en el ADN y se había mostrado que reconoce estructuras tipo *Holliday Junctions in vitro* (Kato et al., 2007). La eliminación de HJURP mediante siRNA reduce drásticamente la carga de nueva CENP-A. Sin embargo, la reducción de NPM1 no tiene un efecto similar. HJURP reconoce el dominio CATD de CENP-A y se localiza en los centrómeros justo en el momento de incorporación de CENP-A, es decir, a principio de la fase G1. Estas evidencias sugieren que HJURP es la chaperona específica de CENP-A en células humanas pero su

mecanismo molecular no se conoce. A pesar de la poca homología de secuencia entre Scm3 y HJURP, ambas parecen compartir un ancestro común (Sánchez-Pulido et al., 2009).

Mis16 (RbAp46/48) es un factor necesario para la localización e incorporación de CENP-A en *S. pombe* (Hayashi et al., 2004) aunque su papel en células humanas es controvertido (Hayashi et al., 2004, Dunleavy et al., 2009). RbAp46/48 también forma parte de la maquinaria de ensamblaje de H3.1 y H3.3, por lo que parece tener un papel general en la incorporación de histonas. En *Drosophila*, RbAp48 inmunoprecipita con H4 y CENP-A y es capaz por sí solo de depositar nucleosomas CENP-A en un ADN de plásmido *in vitro* (Furuyama et al., 2006). Más adelante, un *screening* de interferencia de ARN para genes reguladores de la localización centromérica de CENP-A identificó CAL1 y CENP-C (Erhardt et al., 2008). CAL1 y CENP-A se asocian fuera de la cromatina, en tanto que ambas interaccionan con CENP-C en cromatina. CAL1 aparece en el centrómero durante profase, antes de la deposición de CENP-A, que tiene lugar en metafase. Estos resultados sugieren que CAL1 funciona tanto como de señalizador de la carga como de factor de incorporación de CENP-A (Mellone et al., 2011). No se han identificado homólogos de CAL1 en otros organismos.

### **Papel de Mis18 en la incorporación de CENP-A.**

Mis18 se identificó inicialmente en un *screening* para mutantes que producen defectos de segregación en *S. pombe*. Mis18 forma un complejo con Mis16 (RbAp46/48) y ambos son necesarios para la unión del resto de componentes del cinetocoro (Hayashi et al., 2004). Tanto Mis16 como Mis18 son necesarios para la localización centromérica de CENP-A aunque no se unen a ella directamente. Además, cepas mutantes para estos dos factores muestran un aumento en los niveles de acetilación de histonas en la región centromérica. En células humanas, el complejo Mis18 está compuesto por dos subunidades: hMis18 $\alpha$  y hMis18 $\beta$  que se unen a M18BP1 (*Mis18-binding protein 1*) (Fujita et al., 2007). Las secuencias de hMis18 $\alpha$  y hMis18 $\beta$  son idénticas en un 26% y comparten un dominio conservado rico en cisteínas y glicinas necesario para su localización centromérica. M18BP1 posee un dominio Myb/SANT, generalmente asociado a la interacción con el ADN. El complejo Mis18 aparece en los centrómeros durante un espacio muy breve del ciclo celular que va de anafase hasta inicio de G1. La eliminación del complejo Mis18 mediante siRNA impide la incorporación de CENP-A en G1, pero el tratamiento con TSA, un inhibidor de las histonas deacetilasas, rescata parcialmente este defecto. Este resultado sugiere que Mis18 promueve acetilación en la región centromérica. Sin embargo, este dato es contradictorio con la observación hecha en mutantes *mis18* en levaduras, que sugiere que Mis18 facilita la deacetilación de las histonas centroméricas. El homólogo de M18BP1 en *C. elegans*, KNL2, también es esencial para la incorporación de CENP-A en cromatina pero en este caso la proteína se localiza en los



centrómeros durante todo el ciclo celular (Maddox et al., 2007). En ninguno de los organismos estudiados Mis18 se une directamente a CENP-A. Esto, y el hecho de que su acumulación en los centrómeros precede a la incorporación de CENP-A, ha llevado a la proposición de que el papel de Mis18 es modificar la cromatina centromérica haciéndola permisiva a la entrada de CENP-A (Fujita et al., 2007, Foltz et al., 2009). El tipo de modificación que puede llevar a cabo este complejo se desconoce por completo. En células humanas, HJURP aparece sólo en centrómeros que también tienen Mis18, lo que sugiere que Mis18 podría atraer a HJURP a la región centromérica. De hecho, en *S. pombe* Scm3 interacciona física y genéticamente con Mis18 (Pidoux et al., 2009). Queda aún por determinar cuál es la relación, directa o indirecta, entre estos dos factores en organismos superiores.

### **Remodeladores de la cromatina en la región centromérica.**

El complejo remodelador de la cromatina FACT (*Facilitates Chromatin Transcription*) se ha encontrado en varias de las purificaciones de los complejos asociados a CENP-A (Foltz et al., 2006, Obuse et al., 2004). Es un heterodímero de dos proteínas: SSRP1/FACTp87 y SPT16/FACTp140. La función de este heterodímero es desestabilizar nucleosomas para favorecer la transcripción y su homólogo en *Xenopus* es además indispensable para la replicación del ADN. FACT aparece en los centrómeros de células DT40 de pollo en interfase y en mitosis, y esta localización depende del complejo CENP-H-I (Okada et al., 2009). Además, FACT dirige la localización centromérica de CHD1, otro remodelador de la cromatina. Si bien en *S. pombe* (Walfridson et al., 2005) y células DT40 (Okada et al., 2009) la función de CHD1 parece necesaria para la formación de la cromatina centromérica, lo mismo no ocurre en células S2 de *Drosophila* (Podhraski et al., 2010). Un problema importante de los estudios en células en cultivo es que un defecto en la incorporación de nueva CENP-A puede ser un efecto secundario de fallos en la progresión del ciclo celular en ausencia del factor bajo estudio.

Por otra parte, dos de las subunidades del complejo RSF (*Remodelling and Spacing Factor*), Rsf-1 y SNF2h, también se han encontrado en los inmunoprecipitados de CENP-A. La eliminación de Rsf-1 mediante siRNA en células HeLa tiene un efecto sutil en los niveles de CENP-A en el centrómero, pero en su ausencia, los nucleosomas CENP-A son más susceptibles a extracción con sal. Por esto, se ha propuesto que RSF facilita la incorporación de los nucleosomas CENP-A en la cromatina centromérica (Perpelescu et al., 2009).

Nombre	Localización centromérica	Función	Referencias
CENP-N	continua	componente del CCAN necesario para la incorporación de CENP-A, se une directamente a nucleosomas CENP-A.	(Carroll et al., 2009; Carroll et al., 2010)
CENP-C	continua	componente del CCAN necesario para la formación del cinetocoro, esencial para la incorporación de CENP-A sólo en <i>Drosophila</i> .	(Hori et al., 2008; Gascoigne et al., 2011)
CENP-H-I	continua	componente del CCAN necesario para la incorporación de CENP-A, se une a CENP-N.	(Okada et al., 2006; Okada et al., 2009)
Scm3 <sup>sc</sup>	continua	componente final del nucleosoma centromérico en <i>S. cerevisiae</i> , dirige la incorporación de CENP-A.	(Westermann et al., 2007)
Scm3 <sup>sp</sup>	continua	factor asociado a la forma soluble de CENP-A, necesario para su carga, dependiente de Mis16 y Mis18 en <i>S. pombe</i> .	(Pidoux et al., 2009; Williams et al., 2009)
HJURP	transitoria	factor asociado a la forma soluble de CENP-A, necesario para su estabilidad e incorporación en cromatina.	(Foltz et al., 2009; Dunleavy et al., 2009)
CAL1	transitoria	factor asociado a la forma soluble de CENP-A, esencial para su carga, exclusivo de <i>D. melanogaster</i> .	(Erhardt et al., Mellone et al., 2011)
RbAp46/48	transitoria	chaperona de histonas asociada también a H3.1 y H3.3, esencial para la incorporación de CENP-A sólo en <i>S. pombe</i> .	(Hayashi et al., 2004; Furuyama et al., 2006)
Mis18	transitoria	factor esencial para la incorporación de CENP-A, no interacciona con nucleosomas CENP-A.	(Hayashi et al., 2004; Fujita et al., 2007)
FACT	continua	complejo remodelador de la cromatina asociado a CENP-A, se une al complejo CENP-H-I y dirige la localización de CHD1.	(Okada et al., 2009)
CHD1	continua	complejo remodelador de la cromatina, implicado en la formación de la cromatina centromérica. No esencial en <i>D. melanogaster</i> .	(Walfridson et al., 2005; Okada et al., 2009; Podhraski et al., 2010)

**Tabla 1.** Resumen de los principales factores implicados en la incorporación de CENP-A, se indica su nombre, el tipo de localización centromérica que presenta y su función.

## **2.5 Mecanismos adicionales que evitan la localización ectópica de CENP-A:**

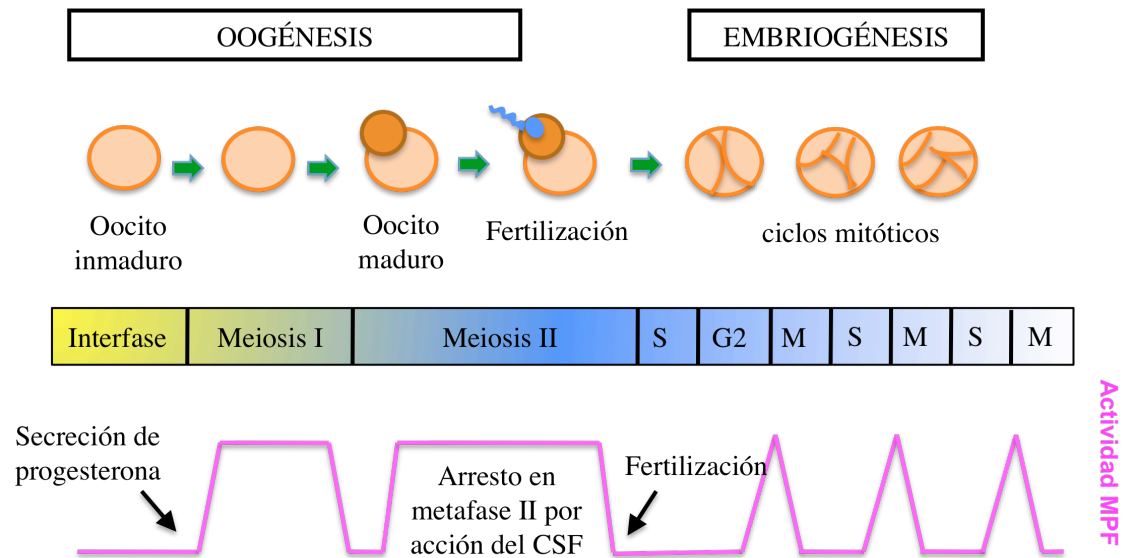
Uno de los mecanismos que parece contribuir a la presencia exclusiva de CENP-A en la región centromérica es la regulación de su transcripción. En células humanas, los niveles de ARN mensajero de CENP-A son bajos durante las fases G1 y S del ciclo celular y aumentan durante G2, de modo que la expresión de CENP-A ocurre justo antes de su incorporación al final de mitosis/inicio de G1 (Shelby et al., 2000). Cuando se induce la expresión de CENP-A durante fase S, ésta se incorpora en toda la cromatina (Shelby et al., 1997). Lo mismo ocurre en levaduras y células de *Drosophila*. Sin embargo, una vez que estas células alcanzan la siguiente fase G1, la CENP-A incorporada fuera del centrómero desaparece y sólo permanece unida a la cromatina centromérica (Collins et al., 2004, Moreno-Moreno et al., 2006). Este proceso requiere proteólisis. En *S. cerevisiae* se ha identificado una E3-ligasa de ubiquitina, Psh1, cuya eliminación causa un ligero aumento en la estabilidad de CENP-A así como su acumulación en regiones de eucromatina en condiciones de sobreexpresión de CENP-A. Se desconoce si Psh1 actúa sobre la fracción de proteína soluble no unida a su chaperona o sobre la localizada en regiones de eucromatina (Ranjitkar et al., 2010, Hewawasam et al., 2010). En *Drosophila*, el número de moléculas de CAL1 por centrómero es mucho menor que el de CENP-A y CENP-C, y se ha sugerido que CAL1 limita la incorporación de ambas proteínas a la cromatina centromérica (Schittenhelm et al., 2010). Además, el recambio de histonas puede tener un papel en la regulación de los niveles de CENP-A en cromatina. En *S. cerevisiae*, CENP-A se incorpora fuera de los centrómeros en células deficientes para CAF-1 e HIRA, dos de los complejos de deposición de H3 (da Rosa et al., 2011).

## **2.6 Extractos de huevos de *Xenopus laevis* como sistema experimental:**

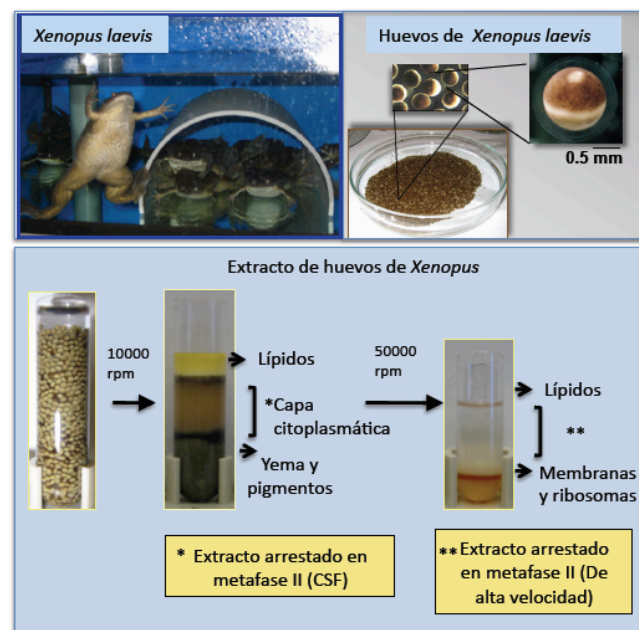
Para el desarrollo del trabajo que se expone a continuación, además de células humanas en cultivo, empleamos como sistema experimental extractos de huevos de *Xenopus laevis*. Desde hace décadas los huevos y embriones de *Xenopus* se emplean en el estudio de la regulación del ciclo celular y en particular en el estudio de la dinámica cromosómica (Philpott and Yew, 2005).

El primer paso en el proceso de oogénesis en *Xenopus* consiste en la producción de oocitos inmaduros arrestados en fase G2 con sus envolturas nucleares intactas. La estimulación con progesterona induce su maduración, lo que hace que rompan su envoltura nuclear, completen la meiosis I y entren en meiosis II. Los oocitos se paran en metafase de meiosis II hasta la fertilización por la acción del factor citostático CSF, que comprende una compleja ruta de señalización cuya finalidad es la inactivación del complejo APC/C (Schmidt et al., 2006). Los oocitos atraviesan el oviducto de las ranas hembra como huevo sin fertilizar. Durante fertilización, la fusión del espermatozoide con el huevo induce un aumento transitorio de la concentración de calcio citoplasmático que inactiva al factor CSF, permitiendo que se complete la meiosis II y la entrada en interfase. El primer ciclo mitótico dura aproximadamente 75 minutos a 22° C y los siguientes –hasta 12– se completan en tan solo 25 minutos (Murray, 1991). En estos ciclos se alternan períodos de síntesis de ADN y períodos de división (mitosis), sin fases G1 ni G2, y no hay puntos de control o *checkpoints*, característicos de los ciclos de células somáticas. La activación e inactivación del MPF (*maturation-promoting factor*) es lo que determina la progresión del ciclo celular. El MPF es una proteína quinasa que consta de una subunidad catalítica, Cdk1 (o cdc2), y una subunidad reguladora, ciclina B. La activación de MPF provoca la entrada en mitosis en tanto que su inactivación induce el inicio de anafase y la consecuente progresión a interfase (Figura 6).

Mediante centrifugación de huevos sin fertilizar se preparan extractos citoplasmáticos denominados extractos CSF o mitóticos. La centrifugación separa yema, pigmentos y lípidos, del citoplasma, y el ADN endógeno se pierde (Figura 7). Sin embargo, es posible añadir ADN exógeno a los extractos citoplasmáticos, en general núcleos de espermatozoide de *Xenopus*, y recapitular en el tubo de ensayo muchos de los procesos del ciclo celular tales como replicación, condensación / decondensación, segregación o formación y rotura de la envoltura nuclear.

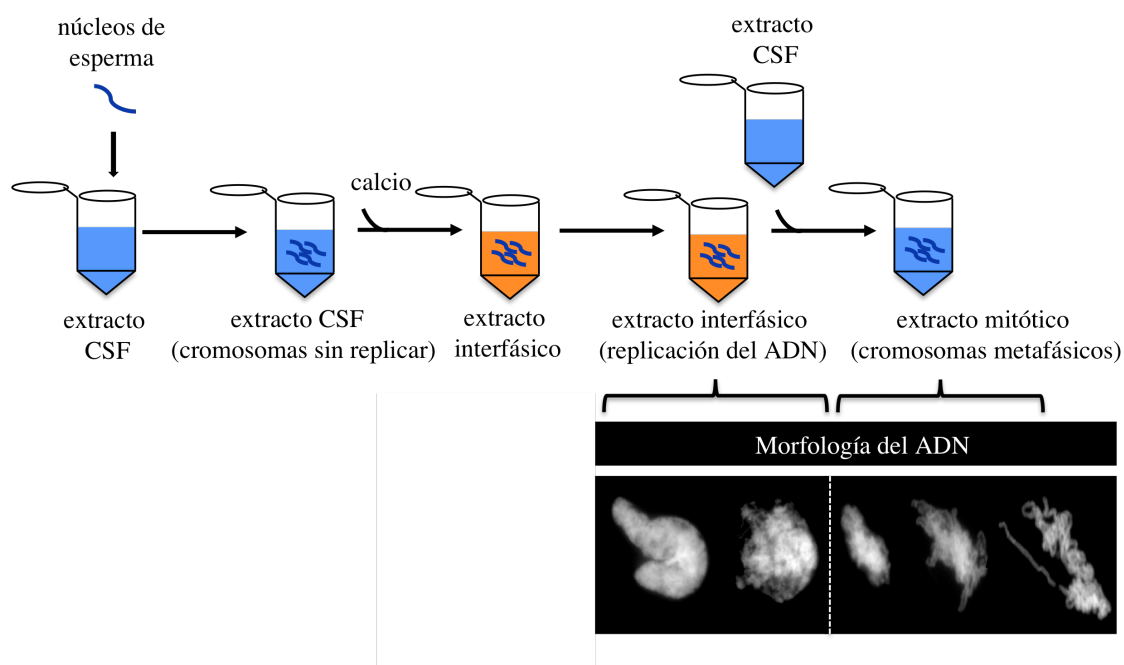


**Figura 6. Representación esquemática de la ovogénesis y embriogénesis en *Xenopus*.** Se muestran los niveles de actividad del MPF a lo largo de la maduración del oocito y las divisiones celulares del embrión de *Xenopus*. Se señalan los puntos de salida de arresto por el CSF, la secreción de progesterona y la fertilización.



**Figura 7.** Imagen de hembras de *Xenopus laevis* (panel superior izquierdo). Imagen de huevos de *Xenopus laevis* tras su recolecta (panel superior derecho). Imágenes de extractos de *Xenopus* tras los procesos de centrifugación.

La adición de núcleos de espermatozoides a un extracto CSF produce el ensamblaje de cromosomas mitóticos en los que las protaminas del espermatozoides se han intercambiado con las histonas del extracto. A continuación, la adición de calcio inactiva el CSF, permitiendo la activación del APC/C y la consiguiente destrucción de la ciclina B e inactivación del MPF. Los cromosomas se descondensan y se rodean de una envoltura nuclear, formando núcleos interfásicos. Comienza entonces la replicación del ADN, que se completa en 80-100 minutos. Es posible entonces inducir de nuevo la entrada a mitosis por adición de más extracto CSF. De nuevo, se forman cromosomas condensados y las cromátidas hermanas se resuelven. (Shamu and Murray, 1992) (Figura 8). Alternativamente, la cromatina del espermatozoides se puede ensamblar directamente en interfase mediante la adición de núcleos de espermatozoides a extractos interfásicos.



**Figura 8. Representación esquemática de una reacción de ensamblaje de cromosomas en extractos de *Xenopus*.** Los extractos mitóticos se representan en azul y los interfásicos en naranja. En la parte inferior de la imagen se muestran imágenes de inmunofluorescencia de la progresión de un núcleo desde interfase hasta la formación de cromosomas mitóticos.

Entre las ventajas del uso de estos extractos como sistema experimental destacamos:

- la posibilidad de preparar extractos sincrónicos, mitóticos o interfásicos.
- la capacidad de reconstituir un determinado proceso en el tubo de ensayo, cuyos requerimientos pueden estudiarse en términos bioquímicos. Muchos de los ensayos funcionales se llevan a cabo eliminando del extracto la proteína de interés usando

anticuerpos específicos. A continuación, se devuelve al extracto la proteína eliminada y se estudia si se recupera o no la funcionalidad.

- la posibilidad de estudio de un único ciclo celular sin acumulación de errores procedentes de ciclos anteriores que puedan enmascarar la función de la proteína de interés.

## **OBJETIVOS**



### 3. OBJETIVOS:

A excepción de la levadura *S. cerevisiae*, los centrómeros no están definidos por una secuencia particular de ADN sino por la presencia de una variante de histona H3 denominada CENP-A. Para una correcta segregación cromosómica, nuevos nucleosomas CENP-A se deben ensamblar en la cromatina del centrómero en cada división celular. En este trabajo estudiamos los mecanismos moleculares que regulan y dirigen la incorporación de CENP-A específicamente al centrómero.

En concreto, los objetivos planteados fueron los siguientes:

1. Desarrollo de un ensayo que nos permita cuantificar la incorporación de nucleosomas CENP-A en cromosomas ensamblados en extractos de huevos de *Xenopus laevis*.
2. Análisis de las características propias de incorporación de CENP-A en extractos de huevos de *Xenopus*, tanto a nivel espacial como temporal, y factores implicados en la misma como HJURP.
3. Estudio del efecto de la organización de la cromatina en estructuras de orden superior, mediada por condensinas, sobre la incorporación y retención de los nucleosomas de CENP-A en la cromatina centromérica .
4. Desarrollo de una línea celular humana estable que exprese de forma inducible una versión marcada de CENP-A (GFP-CENP-A) que nos permita visualizar y cuantificar la incorporación *de novo* de nucleosomas CENP-A.
5. Análisis del mecanismo molecular de acción de factores implicados en la incorporación de CENP-A en células humanas, en particular, el complejo Mis18.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS:

### 4.1. Anticuerpos y proteínas recombinantes:

Para este estudio se produjeron los siguientes anticuerpos contra proteína recombinante: XHJURP, XCENP-T, XMis18, hMis18 $\alpha$ , hMis18 $\beta$  y M18BP1. También se utilizaron los anticuerpos indicados en la Tabla 2.

<b>Anticuerpo</b>	<b>WB</b>	<b>IF</b>	<b>IP</b>	<b>ChIP</b>	<b>Proveedor/referencia</b>
<b>GFP</b>	+	+	+	-	Roche
<b>myc</b>	+	+	+	-	Cell Signaling Technology
<b>MEK2</b>	+	-	-	-	BD Transduction Laboratories
<b>HJURP</b>	+	-	-	-	Sigma
<b>V5</b>	+	-	+	-	Invitrogen
<b>CENP-A</b>	-	+	-	+	Abcam
<b>H3K9 3m</b>	-	-	-	+	Abcam
<b>H4Ac</b>	-	-	-	+	Abcam
<b>H3</b>	+	+	-	-	Abcam
<b>BRG1</b>	+	-	+	-	Abcam
<b><math>\alpha</math>-tubulin</b>	+	+	-	-	Sigma
<b>XCENP-A</b>	+	+	+	-	Rivera and Losada, 2009
<b>GST</b>	+	-	+	-	CNIO
<b>hCENP-A</b>	+	-	+	-	T. Hirano (CSHL, USA)
<b>Ndc80</b>	-	+	-	-	T. Hirano (CSHL, USA)
<b>CREST</b>	-	+	-	-	Y.Muro (Gunna University, Japan)
<b>XCAP-E,G,D3,H2</b>	+	+	-	-	Losada et al., 1997

**Tabla 2.** Anticuerpos utilizados en este estudio. (+) indica que es válido para la técnica especificada y (-) que no se empleó para esa técnica.

Para la producción de las proteínas recombinantes de *Xenopus* myc-CENPA y GFP-CENPA se emplea un sistema de síntesis *in vitro* (“*TnT system*”, Promega) en el cual la transcripción y la traducción ocurren en el tubo de ensayo de forma acoplada. La reacción consiste en la mezcla de polimerasa de ARN, nucleótidos, sales, inhibidores de ribonucleasas y lisado de reticulocito (*TnT Master Mix*) con 1 mM metionina, el molde de ADN (1  $\mu$ g por cada 50  $\mu$ l de reacción) y agua. Requiere un tiempo de incubación de 90 min a 30 °C. El nivel de

expresión de la proteína recombinante se analiza mediante inmunoblot. Las proteínas GST-HJURP y condensina II (XCAP-D3) provienen de los laboratorios de G. Almouzni (Institut Curie, Paris) y M. Dasso (NIH, Bethesda), respectivamente.

#### **4.2 Producción de extractos de huevos de *Xenopus laevis*:**

Los extractos se preparan a partir de huevos recolectados tras una noche de ovulación. Las hembras de rana se preparan para la ovulación tras sucesivas inyecciones con gonadotropina de suero de yegua (PMSG) y posteriormente se induce su ovulación con gonadotropina coriónica humana (HCG). Una vez que se recogen los huevos, se procede a la preparación de los extractos. En primer lugar se realizan varios lavados con tampón MMR (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 5mM HEPES, pH 7.8) y se elimina la cubierta gelatinosa que los envuelve con una solución de 2% cisteína que empaqueta los huevos. A continuación, se lavan con tampón XBE2 (100 mM NaCl, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH 7.7, 5 mM EGTA, 50 mM sacarosa), eliminando los huevos con mal aspecto, como aquellos no uniformes o lisados. Se centrifugan para empaquetarlos a 1500 rpm 60 segundos, se elimina el exceso de tampón y se fracciona el contenido de los huevos por centrifugación a 10000 rpm, 15 minutos a 16°C. Tras este paso se descarta la fracción de lípidos, membranas y pigmentos, y se recoge únicamente la fracción citoplasmática, que constituye los denominados “extractos de baja velocidad” (LSS). Estos extractos provienen de huevos arrestados en metafase II por acción del factor CSF, por eso son considerados como extractos mitóticos. Los extractos LSS pueden ser sometidos a una centrifugación adicional durante 2 horas a 50000 rpm que elimina los restos de lípidos, membranas y ribosomas, obteniendo así “extractos de alta velocidad” (HSS) (Figura 7). Estos últimos no son capaces de llevar a cabo la replicación del ADN.

#### **4.3 Ensayo de carga de CENP-A en extractos de huevos de *Xenopus laevis*:**

Este ensayo se basa en la medida relativa de intensidad de CENP-A entre dos muestras de una misma reacción de ensamblaje tomadas a diferentes tiempos. En la mayoría de los experimentos, el procedimiento es el siguiente: se ensamblan cromosomas mitóticos de *Xenopus* en extractos CSF (control, en los que no se ha eliminado ninguna proteína o en los que se ha eliminado previamente la proteína de interés) mediante la adición de esperma (800-1000 núcleos/ul) y posterior incubación de los mismos durante 40 min a 22°C. Después, esta muestra se divide en dos, una parte se deja incubando durante 50 min más (después de este tiempo se deja en hielo) y otra parte se convierte a interfase. Para esto, se añade 100 ug/ml cicloheximida, que inhibe la síntesis de ciclina B y por lo tanto impide la transición a mitosis, y se incuba durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se añade 0,6 mM CaCl<sub>2</sub> y se incuba a

22°C durante aproximadamente 120 min para obtener núcleos interfásicos. Ambas muestras, cromosomas mitóticos y núcleos en interfase, se mezclan y se centrifugan sobre el mismo cubreobjetos. Se realiza la inmunofluorescencia usando un anticuerpo específico frente a CENP-A y se toman fotos de parejas de núcleos en las que una masa de cromosomas mitóticos aparece junto a un núcleo en interfase. Seguidamente, la intensidad de la señal de CENP-A se mide usando el programa de imagen ImageJ. Se calcula la relación entre la intensidad de CENP-A en los núcleos interfásicos con respecto a la intensidad en los cromosomas mitóticos y el valor obtenido se relativiza con respecto a un porcentaje de 100%, el cual es asignado a la muestra control (en la que no se ha eliminado ninguna proteína). Este porcentaje es el que finalmente se representa como carga de CENP-A.

En los experimentos de las figuras 9-13, en vez de comparar directamente núcleos en interfase y cromosomas mitóticos, comparamos muestras tomadas a diferentes tiempos de una misma reacción de ensamblaje o en diferentes condiciones, por ejemplo, núcleos tratados y sin tratar.

#### **4.4 Eliminación de proteínas de extractos de *Xenopus*:**

Las eliminaciones de cada proteína de interés en extractos LSS se realiza usando bolas de agarosa conjugadas con proteína A (Affiprep Protein A Support, BioRad) que se incuban con los anticuerpos correspondientes: anti-XCENPA, anti-XCAPE (para eliminar condensina I+II), anti-XCAPG (para eliminar condensina I) y una mezcla de anti-XCAPD3, anti-XCAP-G2 y anti-XCAPH2 (para eliminar condensina II), anti-XHJURP y anti-XMis18. Para cada 50 µl de extracto se preparan 25 µl de bolas de agarosa unidas a 15 µg de anticuerpo. En primer lugar, la solución de anticuerpo se incuba con las bolas de agarosa durante 1h a temperatura ambiente en rotación continua. A continuación, las bolas con el anticuerpo unido se lavan con 0,2M tetraborato sódico pH 9,0 y se incuban con 5,7 mg/ml agente entrecruzante (dimetil-pimelidato, Sigma) durante 30 min a temperatura ambiente y en rotación continua. Para inactivar el entrecruzamiento, las bolas se resuspenden en 1 ml de 0,2M etanolamina pH 8,0. Tras realizar 2-3 lavados con esta solución, se dejan durante toda la noche a 4° C con rotación en este tampón. Al día siguiente, se lavan con tampón XBE2 y se bloquean con 3% BSA en XBE2 durante 30 min a 4° C en rotación. Se realizan una ó dos rondas de incubación del extracto LSS con las bolas de 45 min cada una. La recuperación del extracto se realiza mediante centrifugaciones sucesivas a 4°C y 2,8K durante 10 segundos. Los controles de eliminación se realizaron usando bolas de agarosa unidas a IgGs preinmunes de conejo. La eficiencia de cada eliminación se estima mediante *SDS-PAGE* y posterior inmunoblot.

#### **4.5 Generación de la línea celular T-REX-293GFP-CENPA:**

Generamos una línea celular T-REX-293 que expresa de forma estable e inducible CENP-A marcada en el extremo N-terminal con GFP. Para esto, las células son transfectadas de forma transitoria con el plásmido pTREXDEST30-GFPCENPA empleando Effectene (Qiagen) como agente de transfección. Tras 48 h, las células que han incorporado el plásmido son seleccionadas con geneticina o G418 (400 µg/ml) durante 3 semanas. Esta población policlonal se separa célula a célula mediante citometría de flujo empleando un equipo Sorter FACSaria. Posteriormente, se selecciona la población clonal que expresa el nivel de intensidad de GFP más adecuado para el estudio.

Las células se cultivan en medio DMEM suplementado con 10% suero bovino fetal y los siguientes antibióticos: 1% estreptomycin, 1% penicilina, 5 µg/ml blasticidina y 200 µg/ml G418.

#### **4.6 Inmunofluorescencia:**

Las muestras de extractos de huevos de *Xenopus* se procesan para inmunofluorescencia de la siguiente forma: se resuspenden en 5 volúmenes de 0,25% Tritón X-100 en XBE2 durante 5 min y se fijan con dos volúmenes de 0,4% paraformaldehído en tampón XBE2 con 0,1% Tritón X-100 durante 15 minutos. Después, se centrifugan sobre un cubreobjetos sumergido en glicerol al 30% en XBE2 durante 15 minutos a 6750 g. Las muestras se bloquean durante una hora con BSA al 3% en tampón TBST (solución de bloqueo) y a continuación se incuban durante una hora con los anticuerpos primarios diluidos a 2 µg/ml, en el caso de anti-XCENPA, anti-Ndc80, anti-XCENPT, anti-XCAPH2 y anti-XHJURP o 1/1000, en el caso de anti-myc, en solución de bloqueo. Los anticuerpos secundarios utilizados han sido: anti-IgG de conejo conjugada con fluoresceína y anti-IgG de ratón conjugada con cianina 3 (Jackson ImmunoResearch). Se incuban durante 1 hora.

En el caso de células humanas, éstas se crecen sobre un cubreobjetos y se pre-extraen con 0,5% Tritón X-100 en tampón CSK (10 mM Pipes pH 7.0, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> y 300 mM sacarosa) durante 5 minutos a 4°C. Después, se fijan con 3,7% formaldehído en PBS (pH 7,4) durante 15 min y se permeabilizan con 0,2% Tritón X-100 durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se bloquean con 3% BSA en PBS (pH 7,4) durante 1 hora y se incuban con los anticuerpos primarios: CREST, anti-CENPA, anti-M18BP1 ó  $\alpha$ -tubulina durante 1 h. Se emplean los anticuerpos secundarios: anti-IgG de humano, de ratón o de conejo conjugadas con fluoresceína o cianina 3. Se incuban durante 1 hora.

En ambos casos, el ADN se tiñe con DAPI, los cubreobjetos se montan sobre un portaobjetos con Mowiol y se toman imágenes en un microscopio de fluorescencia Leica

equipado con una cámara para tomar imágenes en escala de grises que posteriormente son coloreadas. La superposición de imágenes se realiza usando el programa ImageJ.

#### **4.7 Preparación de muestras para el análisis por citometría de flujo:**

Las células resuspendidas en PBS (pH 7,4) a una concentración de  $10^6$  células/ml, son fijadas con 70% etanol durante al menos 30 min a 4°C. Posteriormente, son lavadas con 4 ml de tampón PBS para eliminar el etanol. El ADN se tiñe con una solución 0,2 mg/ml ARNasa A y 20 µg/ml yoduro de propidio durante 30 min a 37°C. A continuación, se adquieren un mínimo de 5000 eventos/muestra en un citómetro de flujo FACSCalibur.

#### **4.8 Fraccionamiento bioquímico de cromatina:**

Para el aislamiento de cromatina (Mendez and Stillman, 2000), las células se resuspenden en tampón A (10 mM Hepes pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,34M sacarosa, 10% glicerol, 1mM DTT, 5 ug/ul inhibidores de proteasas (mezcla de leupeptina, pepstatina, chimostatina), 0,1 mM PMSF) a una concentración de  $2-4 \times 10^7$  células/ml y se lisan con 0,1% Tritón X-100 durante 5 min en hielo. A continuación, se centrifuga a baja velocidad (3,5 K) durante 4 minutos a 4°C para separar los núcleos de la fracción citoplasmática. Este sobrenadante se centrifuga a alta velocidad (14K) durante 15 min a 4°C para eliminar los restos celulares de la fracción de citosol. La fracción conteniendo los núcleos se trata con tampón B (3mM EDTA, 0,2mM EGTA, 1mM DTT, 5 µg/µl inhibidores de proteasas (mezcla de leupeptina, pepstatina, chimostatina), 0,1 mM PMSF) durante 30 min en hielo para lisar los núcleos. Se centrifuga de nuevo a baja velocidad para separar la fracción de nucleoplasma de la fracción de cromatina. La presencia de las proteínas de interés en las diferentes fracciones se analiza mediante *SDS-PAGE* seguido de inmunoblot. Como control del fraccionamiento, se analizan algunas proteínas de comportamiento conocido: MEK2 es una proteína citoplasmática que sólo aparece en la fracción S3 y H3 es una proteína unida a cromatina por lo que sólo aparece en la fracción P3.

#### **4.9 Preparación de extractos celulares totales:**

Se recogen células HeLa o HEK293T de al menos una placa confluyente (p-100cm) y se resuspenden en tampón de lisis (0,5% NP40, 0,5 mM DTT, 10 µg/ml inhibidores de proteasas (mezcla de leupeptina, pepstatina y chimostatina), 0,1 mM PMSF en TBS) a una concentración de  $5 \times 10^4$  células/µl. Esta suspensión se incuba durante 20-30 minutos en hielo, se resuspende de forma ocasional. A continuación, se sonica 3 veces durante 10 segundos a intervalos de 1 minuto y se añade NaCl hasta alcanzar una concentración final de 0,3M. Se deja rotando durante 30 minutos a 4°C y se centrifuga a máxima revolución durante 5 minutos a 4°C.

Seguidamente, se recupera el sobrenadante conteniendo las proteínas solubles. Finalmente, el extracto se diluye con el objetivo de reducir la concentración de sal y aumentar su densidad, para ello se añade un volumen de agua y un volumen de tampón de dilución (2x) (30% glicerol, 40 mM Tris pH 7,5, 1 mM DTT, 20 µg/ml inhibidores de proteasas (LPC), 0,2 mM PMSF).

#### **4.10 Preparación de extractos nucleares de células HeLa:**

En general,  $30 \times 10^6$  células se resuspenden en 1 ml de tampón osmótico (10 mM HEPES a pH 7,9, 0,2 M acetato potásico, 0,34 M sacarosa, 10% glicerol, 1 mM DTT, 1 mM NaVO<sub>4</sub>, 5 mM β-glicerofosfato, 0,1 mM PMSF, 0,5 mM NaF, cocktail de inhibidores de proteasas (Roche)). Se añade Tritón X-100 a una concentración final de 0,1% y se incuba durante 5 min a 4°C. A continuación, el lisado se centrifuga a 1600 rpm durante 4 min a 4°C. Se retira el sobrenadante conteniendo la fracción citoplasmática de la célula y se resuspende el pellet correspondiente a la fracción nuclear en 1 ml de tampón hipotónico con detergente (0,1% Tritón X-100, 10 mM HEPES a pH 7,9, 1mM DTT, 1 mM NaVO<sub>4</sub>, 5 mM β-glicerofosfato, 0,1 mM PMSF, 0,5 mM NaF, cocktail de inhibidores de proteasas (Roche)). Después, se añade 250 mM acetato potásico y 10 mM CaCl<sub>2</sub> y se digiere la cromatina con 8 U de nucleasa micrococcal (Sigma) en agitación durante 25 minutos a 24°C. Se detiene la digestión con 2 mM EGTA. La fracción insoluble se descarta por centrifugación a 16000 g durante 25 min a 4°C, el sobrenadante se utiliza para la inmunoprecipitación después de medir la concentración de proteína mediante un ensayo Bradford.

#### **4.11 Inmunoprecipitación:**

En las inmunoprecipitaciones a partir de extractos HSS de *Xenopus* y extractos totales de células, se añaden entre 2-5 µg de anticuerpo por cada 100 µl de extracto. Se incuba durante 2 h en hielo y se añaden 10 µl de bolas de Proteína A agarosa (Invitrogen). La mezcla de anticuerpo y bolas de garosa se incuba durante 1 h en rotación continua a 4°C. Después, se centrifuga a 5000-6000 rpm durante 1 minuto, se recoge el sobrenadante conteniendo el extracto sin la proteína de interés (*FT*, *flow through*) y se realizan varios lavados con el tampón en el que se encuentra el extracto (tampón XBE2 para los extractos de *Xenopus* y tampón de dilución para las células). Finalmente, las bolas conteniendo la fracción inmunoprecipitada se resuspenden en tampón de carga para su posterior análisis por inmunoblot. Como control de la inmunoprecipitación se utilizan IgGs preinmunes de conejo o ratón.

En las inmunoprecipitaciones a partir de extractos nucleares de HeLa, se utilizan entre 800-1000 incuba en hielo durante 2-3 horas. Después, se añaden 30 µl de bolas magnéticas cubiertas con Proteína A (PureProteome Protein A, Millipore) y se incuba en rotación continua a 4°C durante 2h. La mezcla de extracto y bolas de agarosa se coloca sobre un imán y se recoge



el extracto sin la proteína de interés (*FT*, *flow through*). Las bolas se lavan varias veces con tampón salino y finalmente, se resuspenden en tampón de carga para su análisis por inmunoblot o se digieren con tripsina para su análisis por espectrometría de masas. Como control de la inmunoprecipitación se utilizan IgGs preinmunes de conejo.

#### **4.12 ARN interferente:**

Para silenciar la expresión de los genes hMis18 $\alpha$  y HJURP se realizaron dos rondas de transfección de *RNAi* separadas 24 h entre sí empleando Dharmafect (Dharmacon) y una concentración final de 100 nM *siRNA*, utilizando medio sin antibióticos. Las células se siembran a una concentración inicial de  $0,6 \times 10^6$  células/ml para tener en la primera transfección una confluencia del 40-50% y se recogen a las 72 h. Los controles negativos se realizan siguiendo el mismo protocolo pero con agua en vez de *siRNA*. La eficiencia de la eliminación de la proteína de interés se analiza por inmunoblot. Las secuencias de RNA interferente son sintetizadas por *Thermo Scientific* como se indica:

hMis18 $\alpha$ : 5-CAGAAGCUAUCCAAACGUGTT-3

HJURP: 5-CUACUGGGCUCAACUGCAAUU-3

#### **4.13 Inmunoprecipitación de cromatina (*ChIP*) y *Q-PCR*:**

Células T-Rex-293-GFP-CENPA se fijan directamente en las placas de cultivo con 1% de formaldehído durante 15 min en agitación. La reacción de entrecruzamiento se inhibe añadiendo glicina 125mM. Tras 5 min, las células se lavan dos veces con PBS frío y se recogen de las placas con un raspador, se centrifugan 5 min a 4K y 4°C. Después, se resuspenden en tampón de lisis (1%SDS, 10mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8,1) y se incuban por 10 min en hielo. La cromatina se fragmenta en un sonicador de baño hasta un tamaño aproximado de 200 pb. Estas muestras se centrifugan a 14K, 15 min y temperatura ambiente. Se recogen los sobrenadantes que contienen la cromatina fragmentada y se mide la concentración de ADN obtenido, se guardan 20  $\mu$ g de cromatina total como *input*. El resto se diluye 10 veces en tampón de dilución (1% Tritón X-100, 2mM EDTA pH 8,0, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,1) y se incuban con 150  $\mu$ l de bolas de agarosa cubiertas por una mezcla de Proteína A y G (Protein A/G Plus Agarose, Santa Cruz) durante 1h a 4°C en rotación continua para pre-lavar la cromatina. Después, se recoge el sobrenadante por centrifugación a 4K y 4°C por 5 min. Se utilizan 200  $\mu$ g de muestra por cada reacción de inmunoprecipitación a la que se añaden 10  $\mu$ g de cada anticuerpo, se incuban toda la noche a 4°C en rotación continua. Tras ello, se añaden 60  $\mu$ l de bolas de Proteína A/G durante 2h a 4°C en rotación. Se recuperan y lavan por centrifugación a 2K y 4°C durante 5 min. Primero se utiliza un tampón de baja concentración de sal (0,1% SDS,

1% Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8,1, 150 mM NaCl). Después, uno de alta concentración salina (0,1% SDS, 1% Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8,1, 500 mM NaCl), un tampón de lavado con LiCl (0,25 M LiCl, 1% NP-40, 1% deoxycolato sódico, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8,1) y tampón TE (Tris-HCl pH 8,1, 1 mM EDTA) que se utiliza dos veces. Por último, el ADN unido a las bolas se eluye con 250 µl de tampón de elución fresco (1% SDS, 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>). Los sobrenadantes de dos eluciones consecutivas se juntan y se revierte el entrecruzamiento con 0,2M NaCl e incubación a 65°C toda la noche. Para digerir la proteína asociada al ADN, se añade 40 mM Tris-HCl pH 6,5, 2 mM EDTA y 100 µg/ml Proteinasa K y se incuba 1 h a 45°C. El ADN se recupera por extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol. Para la PCR cuantitativa se usa SybrGreen Master Mix y se realizan PCRs por triplicado de cada muestra. Usando el programa SDS, las muestras se normalizan con respecto a al control (células transfectadas con una mezcla sin siRNA) y se calcula el enriquecimiento (*fold change*) de cada una con respecto a la cromatina total (*input*). Para la amplificación de la región centromérica se utilizan oligos comerciales (*Hsalpha Satellite repeat ChIP Primers*, Abcam, ab85782) que hibridan en una de las repeticiones de ADN satélite del cromosoma 1, el proveedor no indica su secuencia o la repetición exacta que reconoce. Para la amplificación de la región pericentromérica, se emplean oligos comerciales (*HsSatellite 2 repeat ChIP Primers*, Abcam, ab85781) específicos para la repetición 2 de una región juxtacentromérica del cromosoma 1. El proveedor no indica su secuencia.

#### **4.14 Inmunoprecipitación de ARN (RNA-ChIP) y QRT-PCR:**

El protocolo de *RNA-ChIP* es muy similar al de *ChIP* convencional (4.13) a excepción de las modificaciones que se indican a continuación. La incubación con 0,2 M NaCl para revertir el entrecruzamiento se realiza a 65°C durante sólo 2h, en vez de toda la noche, para proteger el ARN. Además, después de la extracción con fenol /cloroformo, se elimina el ADN precipitado mediante digestión con *DNase I* durante 25 min a 37°C. El enzima se inactiva por extracción con fenol/cloroformo y el ARN se precipita con etanol. Se realiza una reacción de retrotranscripción con SuperScript II (Invitrogen) siguiendo el protocolo que indica el proveedor y se calcula mediante PCR cuantitativa el enriquecimiento (*fold change*) en ARN de cada inmunoprecipitado con respecto al ARN total (*input*). Se restan los valores de fondo obtenidos en una reacción control en la que se ha omitido la retrotranscripción. Para la amplificación se emplean los siguientes oligos específicos para la repetición 11-mer del ADN alfoide del cromosoma 21 (Nakano et al., 2003):

11-10R, 5'-AGGGAATGTCTTCCCATAAAACT-3'  
mCbox-4, 5'-GTCTACCTTTTATTTGAATTCCCG-3'

**4.15 Tratamiento con *RNase A*:**

En primer lugar, las células crecidas sobre un cubreobjetos son preextraídas con detergente con el fin de eliminar la fracción de proteína soluble en el núcleo. Para esto, las células se lavan con tampón CSK ((10 mM Pipes pH 7.0, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> y 300 mM sacarosa) a temperatura ambiente y se incuban en tampón CSK/0,5%Tritón X-100 durante 5 minutos en hielo. A continuación, se lavan 2 veces con tampón PBS durante 3 minutos a temperatura ambiente. Una vez realizada la preextracción, las células se incuban en tampón PBS conteniendo 1mg/ml de RNasa A (Roche) durante 10 min a temperatura ambiente. De nuevo, se lavan 2-3 veces con tampón PBS durante 3 minutos y se fijan con 2% paraformaldehído durante 15 minutos, ambos a temperatura ambiente. Para conseguir una mayor eliminación de la fracción soluble presente en el núcleo, se permeabilizan las células con 0,2%Tritón X-100 en PBS durante 5 min en hielo. Finalmente, se realiza la inmunofluorescencia de manera ordinaria.

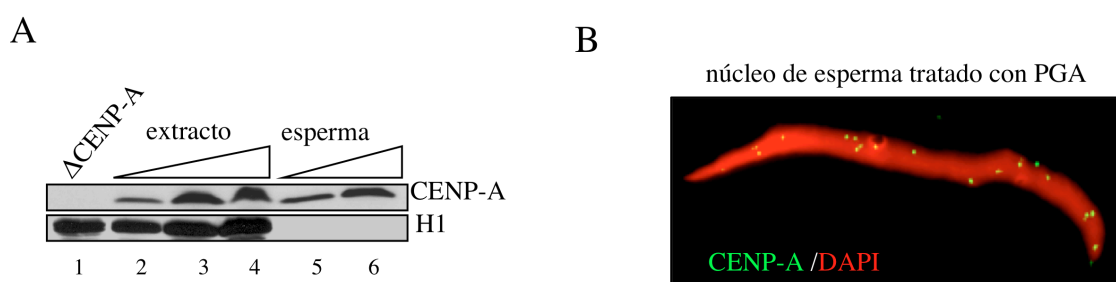
## **RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS:

### Parte I. Estudio de la incorporación de CENP-A en extractos de huevos de *Xenopus laevis*.

#### 5.1 Desarrollo de un ensayo para medir la incorporación de CENP-A:

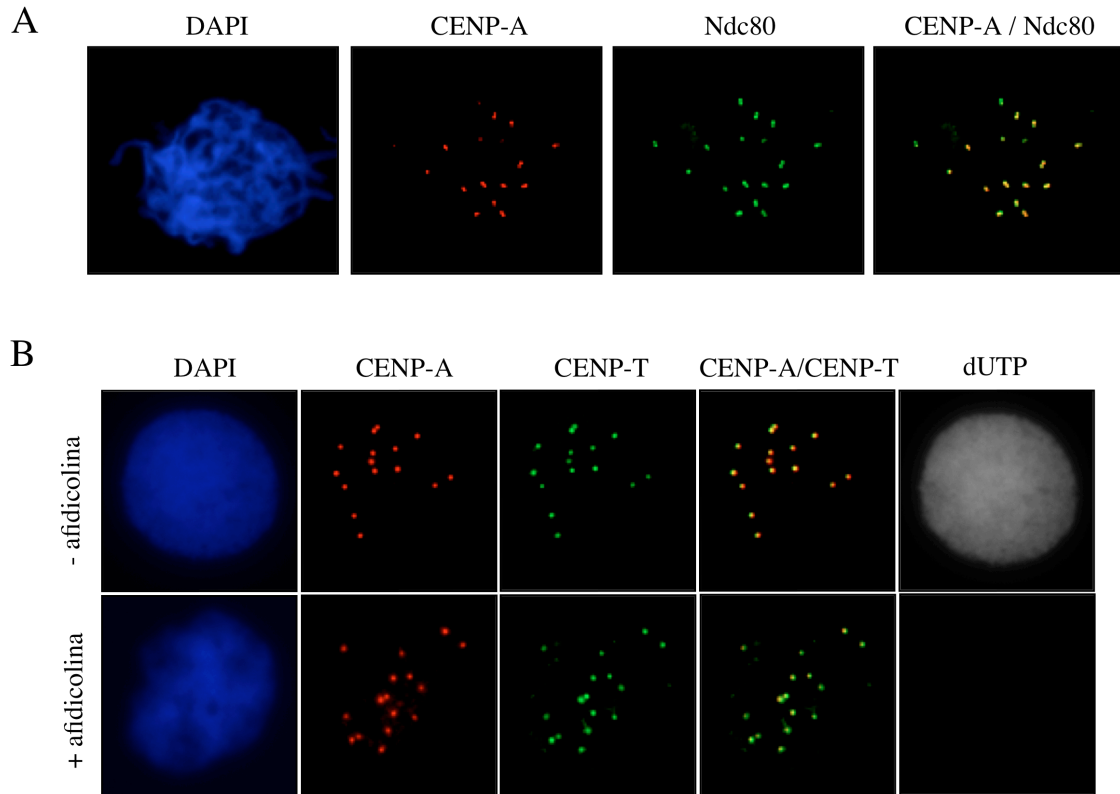
Los extractos obtenidos a partir de huevos de *Xenopus laevis* pueden recapitular en el tubo de ensayo muchos de los procesos del ciclo celular si se les añade ADN exógeno, en nuestro caso, núcleos de espermatozoides. Durante la espermatogénesis, la cromatina del espermatozoides se remodela de forma que las histonas H2A y H2B son sustituidas por protaminas y la histona H1 es eliminada (Philpott et al., 1992). Sin embargo, la histona centromérica CENP-A permanece en esta cromatina y puede detectarse mediante inmunoblot (Figura 9A). Asimismo, cuando se tratan núcleos de espermatozoides con ácido poliglútamico (PGA) para provocar su descondensación de forma artificial, sin incubación en el extracto, y se tiñen con anti-CENP-A, también se observan focos que parecen corresponder a centrómeros (Figura 9B).



**Figura 9. La cromatina del espermatozoides contiene CENP-A.** (A) Análisis por inmunoblot de cantidades crecientes de extracto: 1, 2 y 3  $\mu$ l (carriles 2-4) y  $3 \times 10^6$  y  $6 \times 10^5$  núcleos de espermatozoides (carriles 5 y 6). Como control, se toma una alícuota de 1  $\mu$ l de extracto en el que se ha eliminado CENP-A (carril 1). A diferencia de H1, CENP-A está presente tanto en el extracto soluble como en los núcleos de espermatozoides. (B) Imagen de inmunofluorescencia de un núcleo de espermatozoides tratado con ácido poliglútamico (PGA) teñido con anti-CENP-A (verde) y DAPI (rojo).

Puesto que CENP-A está presente en los núcleos de espermatozoides, decidimos, en primer lugar, estudiar la incorporación de nueva CENP-A a los centrómeros añadiendo al extracto una CENP-A exógena, myc-CENP-A, que puede detectarse mediante tinción con anti-myc. Si bien esta proteína era capaz de incorporarse a los centrómeros, dicha incorporación era muy ineficiente (datos no mostrados). Por ello, decidimos llevar a cabo otra estrategia que consiste en medir el incremento en la cantidad de CENP-A presente en los centrómeros, cuantificando señales de fluorescencia obtenidas con anti-CENP-A. Cabe señalar que este anticuerpo funciona muy bien y detecta entre 10 y 20 focos por masa de cromosomas proveniente de un núcleo de espermatozoides, lo cual está de acuerdo con el número de cromosomas en *X. laevis*, que es 18. Estos

focos co-localizan perfectamente con marcadores del cinetocoro como Ndc80 (Figura 10A). En núcleos interfásicos, CENP-A presenta una señal similar, en forma de focos que colocalizan con CENP-T, un componente constitutivo del centrómero (Hori et al., 2008). Si bien un estudio reciente en células humanas sugiere que CENP-A se incorpora también en lugares en los que se produce daño al ADN (Zeitlin et al., 2009), la adición al extracto de afidicolina, una droga que bloquea la replicación y causa daño al ADN, no modifica la tinción de CENP-A (Figura 10B).



**Figura 10. CENP-A sólo está presente en el centrómero.** (A) Cromosomas mitóticos obtenidos tras incubar núcleos de espermatozoides en extractos de *Xenopus* se tiñen con anti-CENP-A (rojo) y anti-Ndc80 (verde). La señal de CENP-A se detecta exclusivamente en la región centromérica, definida por la tinción de Ndc80. (B) Núcleos interfásicos procedentes de extractos tratados o no con afidicolina y teñidos con anti-CENP-A (rojo), anti-CENP-T (verde), streptavidina para visualizar la incorporación de biotina-dUTP (gris) y DAPI (azul).

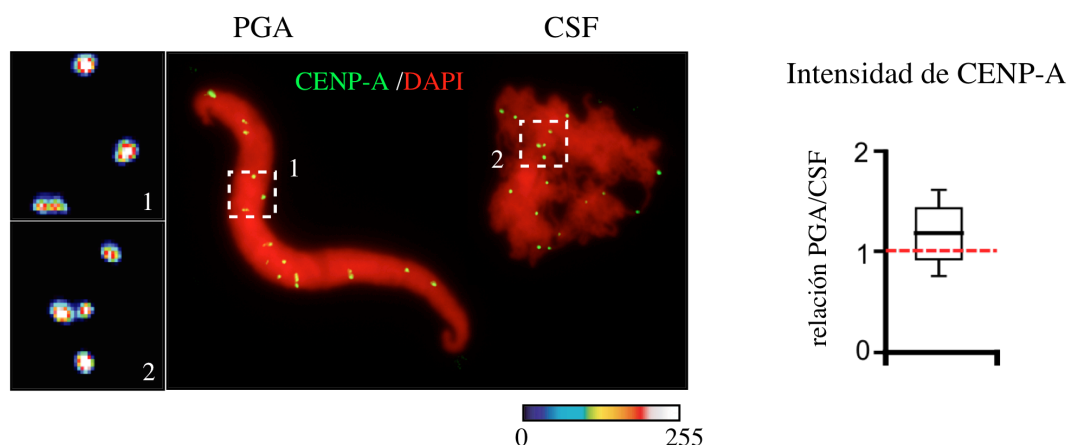
Para evitar variaciones durante el protocolo de tinción con el anticuerpo que reconoce CENP-A, nuestro ensayo mide la intensidad relativa de CENP-A en dos muestras tomadas a diferentes tiempos de una misma reacción de ensamblaje que han sido mezcladas y centrifugadas sobre un mismo cubreobjetos. Tras la tinción, se toman fotos en las que aparezcan dos núcleos o masas de cromosomas, cada uno proveniente de una muestra. Ambos tipos de muestras se identifican por su diferente morfología o por la incorporación de un nucleótido marcado, biotina-dUTP, que permite seguir el proceso de replicación. Seguidamente, se mide la

intensidad de la señal de CENP-A usando el programa de imagen ImageJ. Se calcula la relación entre la intensidad de CENP-A en los dos núcleos de la imagen y se repite el proceso con al menos 15 parejas. Con los datos obtenidos se calcula el incremento relativo en la cantidad de CENP-A centromérica. El procedimiento se detalla en el apartado de Materiales y Métodos (5.3).

## 5.2 Control temporal de la incorporación de CENP-A:

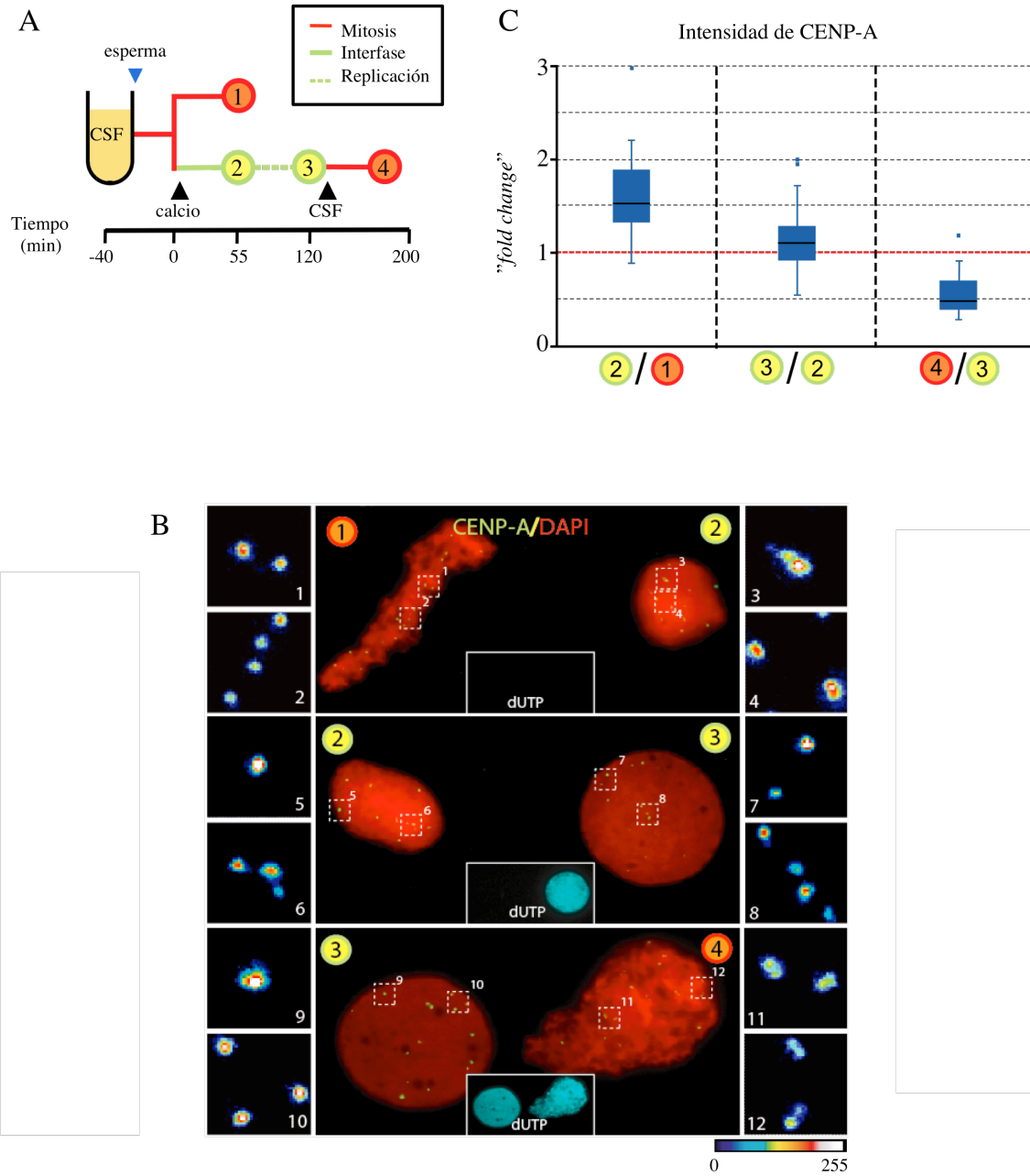
### La incorporación de CENP-A ocurre al inicio de interfase.

En primer lugar, comparamos la señal de CENP-A entre cromosomas mitóticos ensamblados en extracto CSF y núcleos de espermatozoides descondensados con PGA (Figura 11). La relación entre ambas intensidades da un valor cercano a 1 ( $1,2 \pm 0,1$ ), lo que indica que no hay incorporación de CENP-A durante la incubación en extracto CSF.



**Figura 11. La incorporación de CENP-A no tiene lugar durante mitosis.** Núcleos de espermatozoides se incuban con ácido poliglutámico (PGA) o en extracto CSF, ambas muestras se mezclan, se centrifugan sobre un único cristal y se tiñen con anti-CENP-A (verde) y DAPI (rojo). Los dos tipos de núcleos se monitorizan en la misma imagen (se muestra una imagen representativa) y se mide la intensidad de CENP-A en 15 parejas. Las imágenes amplificadas a un lado de la foto muestran la intensidad de CENP-A en algunos de los centrómeros de cada núcleo siguiendo un gradiente de color, según el cual, la máxima intensidad (255) se representa en blanco y la menor (0) en azul. El gráfico representa la relación de intensidad de CENP-A entre ambos núcleos.

Para determinar si podía detectarse incorporación de CENP-A en el sistema de extractos de *Xenopus* y determinar cuándo tenía lugar, tomamos muestras a distintos tiempos en una reacción de ensamblaje y comparamos las señales de CENP-A entre dos puntos consecutivos. Tras incubación de núcleos de espermatozoides en un extracto CSF durante 40 min, a una parte de la reacción se le añade calcio para inducir entrada en interfase (ver esquema en Figura 12A). Transcurridos 55 min se toma una muestra que corresponde a núcleos interfásicos que aún no han comenzado a replicar (muestra 2 en Figura 12A-C), se mezcla con una muestra de cromosomas mitóticos



**Figura 12. CENP-A se deposita en los centrómeros al inicio de interfase en *Xenopus laevis*.** (A) Esquema de la reacción de ensamblaje y los tiempos en los que se toman muestras para su análisis. Las flechas negras indican adiciones al extracto. (B) Imágenes representativas de parejas de núcleos pertenecientes a tiempos consecutivos de una misma reacción que han sido procesados juntos y monitorizados en la misma imagen. Los núcleos se tiñen con anti-CENPA (verde) y DAPI (rojo). La replicación del ADN se visualiza mediante la incorporación de biotina-dUTP (azul, inserción en el centro de la imagen). Las imágenes amplificadas a ambos lados de cada foto muestran la intensidad de CENP-A en algunos de los centrómeros de cada núcleo siguiendo un gradiente de color, según el cual, la máxima intensidad (255) se representa en blanco y la menor (0) en azul. (C) Gráfico que representa la variación en la intensidad de CENP-A entre dos muestras correspondientes a tiempos consecutivos de una reacción. Para cada muestra se cuantifican 15 parejas de núcleos en al menos dos experimentos independientes.



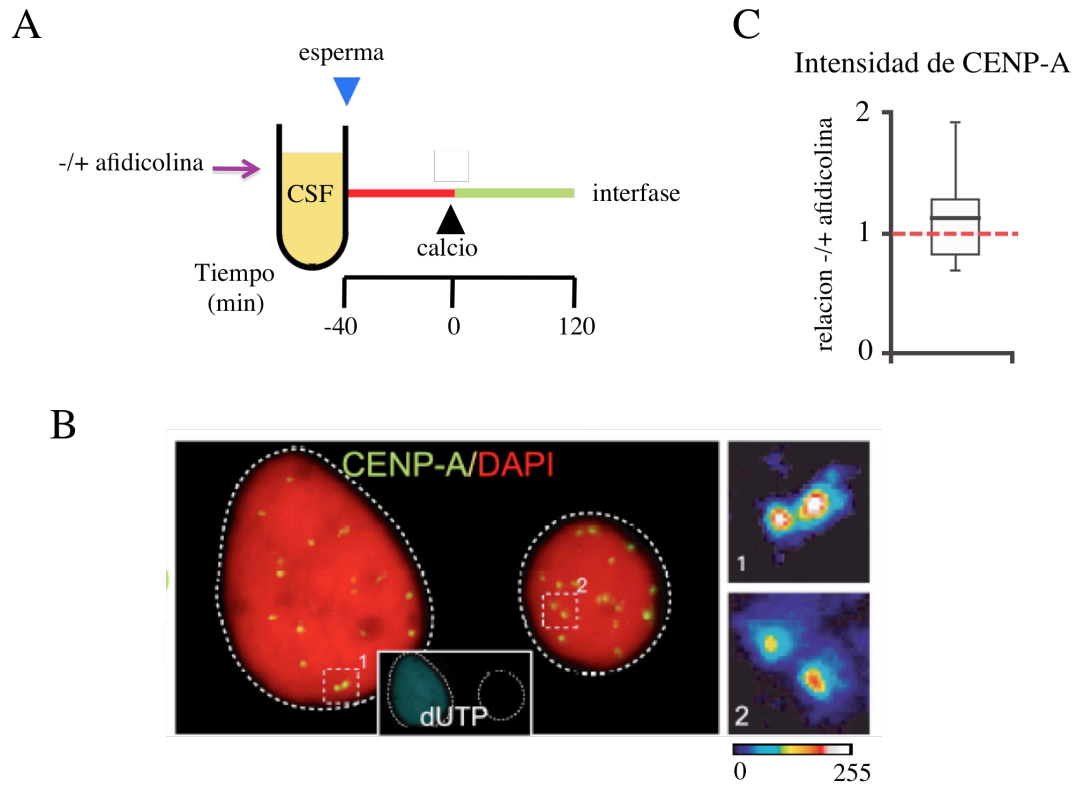
(muestra 1 en Figura 12A-C) y se procesan para inmunofluorescencia como se ha descrito anteriormente. Imágenes representativas de los núcleos que se obtienen y se analizan se muestran en la Figura 12B. El análisis cuantitativo revela un claro aumento en la intensidad de CENP-A en esta muestra con respecto a la de los cromosomas mitóticos, lo que indica que ha habido incorporación de nueva CENP-A en este período (gráfico en Figura 12C). Por el contrario, al comparar una muestra de núcleos que han permanecido 120 min en el extracto interfásico y han completado la replicación del ADN, como indica la incorporación de biotina-dUTP (muestra 3 en Figura 12A-C), no se observan diferencias significativas entre la intensidad de CENP-A con respecto a la del punto anterior. Esto sugiere que no hay carga de CENP-A durante fase S.

Finalmente, cuando añadimos extracto CSF a los núcleos interfásicos para promover la vuelta a mitosis y por tanto, la formación de cromosomas condensados, la intensidad de CENP-A disminuye prácticamente a la mitad (muestra 4 en Figura 12A-C). Esta disminución se debe a que en el proceso de condensación cromosómica los centrómeros hermanos, que en interfase están tan juntos que aparecen como un único foco, se separan ligeramente, lo que hace que cada señal de CENP-A se divida en dos. Como no hay incorporación de nueva CENP-A en este tiempo, cada centrómero muestra la mitad de intensidad que la muestra anterior.

Así pues, estos resultados indican que es posible recapitular en el sistema de extractos de huevos de *Xenopus* el proceso de incorporación de CENP-A específicamente a la cromatina del centrómero. Además, se muestra que esta incorporación no tiene lugar en mitosis, sino en interfase, posiblemente antes de que comience la replicación del ADN.

### **La carga de CENP-A es independiente de la replicación del ADN.**

Si bien la carga de nueva CENP-A no parece acoplada a la replicación del ADN, puede que la replicación de las regiones centroméricas preceda a la del resto del genoma y sea difícil de detectar. Para descartar un requerimiento de la replicación del ADN, comparamos la cantidad de CENP-A incorporada en presencia y ausencia de afidicolina, una droga que inhibe las ADN polimerasas replicativas. Un esquema de la reacción de ensamblaje se presenta en la Figura 13A. Transcurridos 120 min tras la adición de calcio, los núcleos obtenidos en las dos reacciones (con y sin afidicolina) se mezclan y analizan. Los núcleos del extracto con afidicolina se distinguen porque no muestran incorporación de biotina-dUTP (Figura 13B). Puesto que no se observan diferencias en la intensidad de CENP-A en núcleos interfásicos en ambas condiciones (Figura 13C), se puede concluir que la replicación no es un proceso necesario para la incorporación de CENP-A.

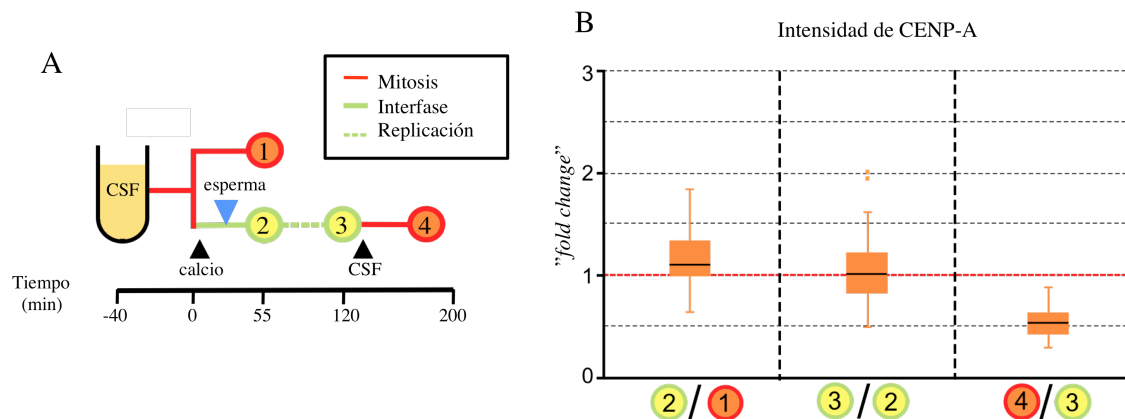


**Figura 13. La incorporación de CENP-A no depende de la replicación del ADN.** (A) Esquema representativo de la reacción de ensamblaje. Previamente a la adición de esperma se añade o no afidicolina al extracto CSF. (B) Imágenes representativa de una pareja de núcleos procedentes de un extracto sin (izquierda) y con afidicolina (derecha) teñidos con anti-CENPA (verde) y DAPI (rojo). La replicación del ADN se visualiza mediante la incorporación de dUTP (azul verdoso). (C) Gráfico que representa la relación entre la intensidad de CENP-A en núcleos interfásicos sin tratar y tratados con afidicolina. No se observan diferencias significativas entre ambas muestras.

### El paso por mitosis es un requisito para la carga de CENP-A.

En los experimentos mostrados en las Figuras 12 y 13, los núcleos interfásicos que incorporan nueva CENP-A provienen de un extracto mitótico ya que el ADN de esperma se añade a extracto CSF y tras 40 min se induce su conversión a interfase. Para comprobar si el paso previo por mitosis es un requisito para la incorporación de CENP-A en la siguiente interfase, repetimos el experimento de la Figura 12 incubando los núcleos de esperma en un extracto que ya es interfásico pues se le ha añadido calcio 40 min antes. Como anteriormente, se toman muestras a distintos tiempos en el transcurso de esta reacción para analizar el contenido en CENP-A. En paralelo, se ensamblan cromosomas mitóticos en extracto CSF (muestra 1 en Figura 14A y B) que sirvan de referencia para la primera muestra interfásica (muestra 2). En estas condiciones, no hay incremento en la señal de CENP-A en núcleos en interfase (muestras 2 y 3 en Figura 14A y B) lo que indica que no hay incorporación de nueva CENP-A en cromatina. De igual

forma que en el experimento de la Figura 12, en mitosis la señal disminuye a la mitad debido a la separación de los centrómeros hermanos (muestra 4 en Figura 14A y B). Estos resultados indican que el paso a través de mitosis es indispensable para la incorporación *de novo* de nucleosomas CENP-A al comienzo de interfase.



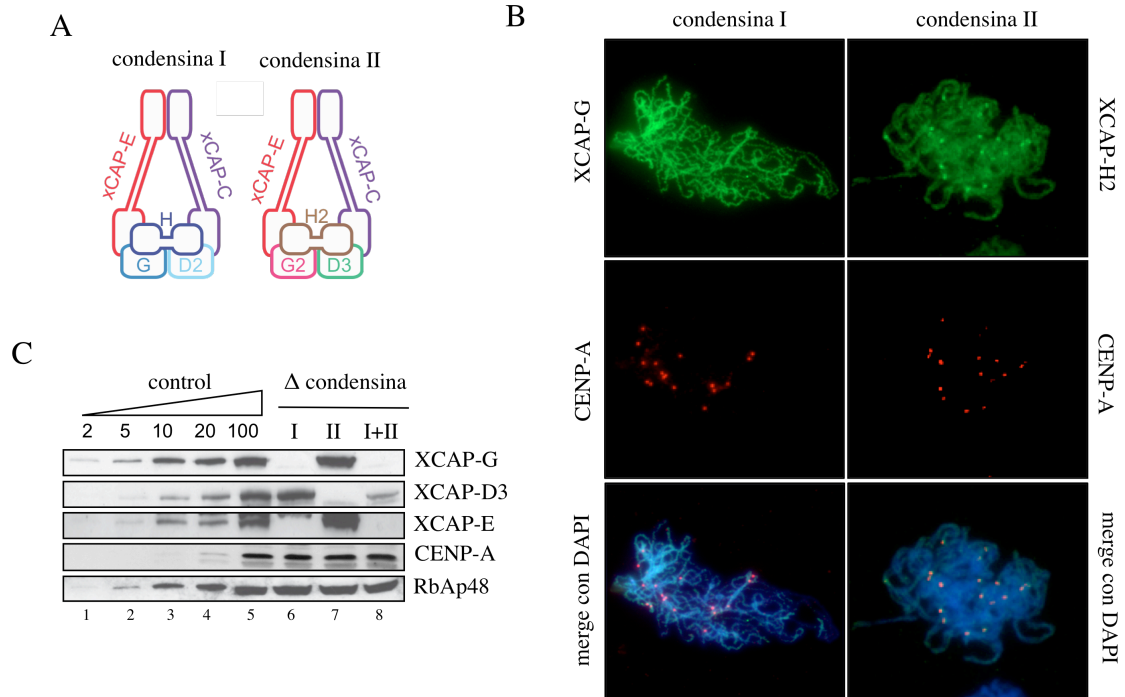
**Figura 14. El paso por mitosis es un requisito para la incorporación de CENP-A.** (A) Esquema de la reacción de ensamblaje y de los tiempos a los que toman muestras. Las flechas indican adiciones al extracto. (B) Gráfico que muestra la variación en la intensidad de CENP-A entre las muestras que se indican. No se observa incremento en la señal de CENP-A en núcleos al comienzo de interfase o una vez finalizada la replicación. En mitosis, la intensidad de CENP-A disminuye a la mitad debido a la separación de los centrómeros hermanos. Los datos que se representan proceden del análisis de 15 parejas de núcleos en dos experimentos independientes.

### 5.3 Papel del complejo condensina en la función del centrómero:

#### Localización de condensina I y condensina II.

Puesto que el paso a través de mitosis es necesario para la incorporación de CENP-A, nos preguntamos cuál de los procesos que ocurren durante este período puede ser importante para dicha incorporación. Uno de los principales eventos mitóticos en lo que se refiere a la estructura cromosómica es la condensación, proceso mediado por un complejo de la familia de ATPasas cromosómicas SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*) denominado condensina. En la mayoría de organismos eucariotas existen dos complejos condensina: condensina I y condensina II. Ambos poseen en común las subunidades SMC: SMC2/CAP-E y SMC4/CAP-C, pero difieren en las subunidades reguladoras: CAP-D2, CAP-G, CAP-H en condensina I y CAP-D3, CAP-G2 y CAP-H2 en condensina II (Hirano, 2005) (Figura 15A). En células somáticas, ambos complejos son igualmente abundantes. Sin embargo, en extractos de huevos de *Xenopus* la condensina I es 5 veces más abundante que condensina II y tiene un papel predominante en la

condensación de los cromosomas. Ambos complejos se detectan a lo largo de todo el eje cromosómico, pero curiosamente, la condensina II se acumula preferentemente en la región centromérica (Figura 15B). Empleando anticuerpos frente a subunidades comunes y no comunes es posible eliminar del extracto las dos proteínas a la vez o por separado, respectivamente, con una eficiencia superior al 95% (Figura 15C). Esta eliminación no afecta a los niveles de CENP-A soluble.

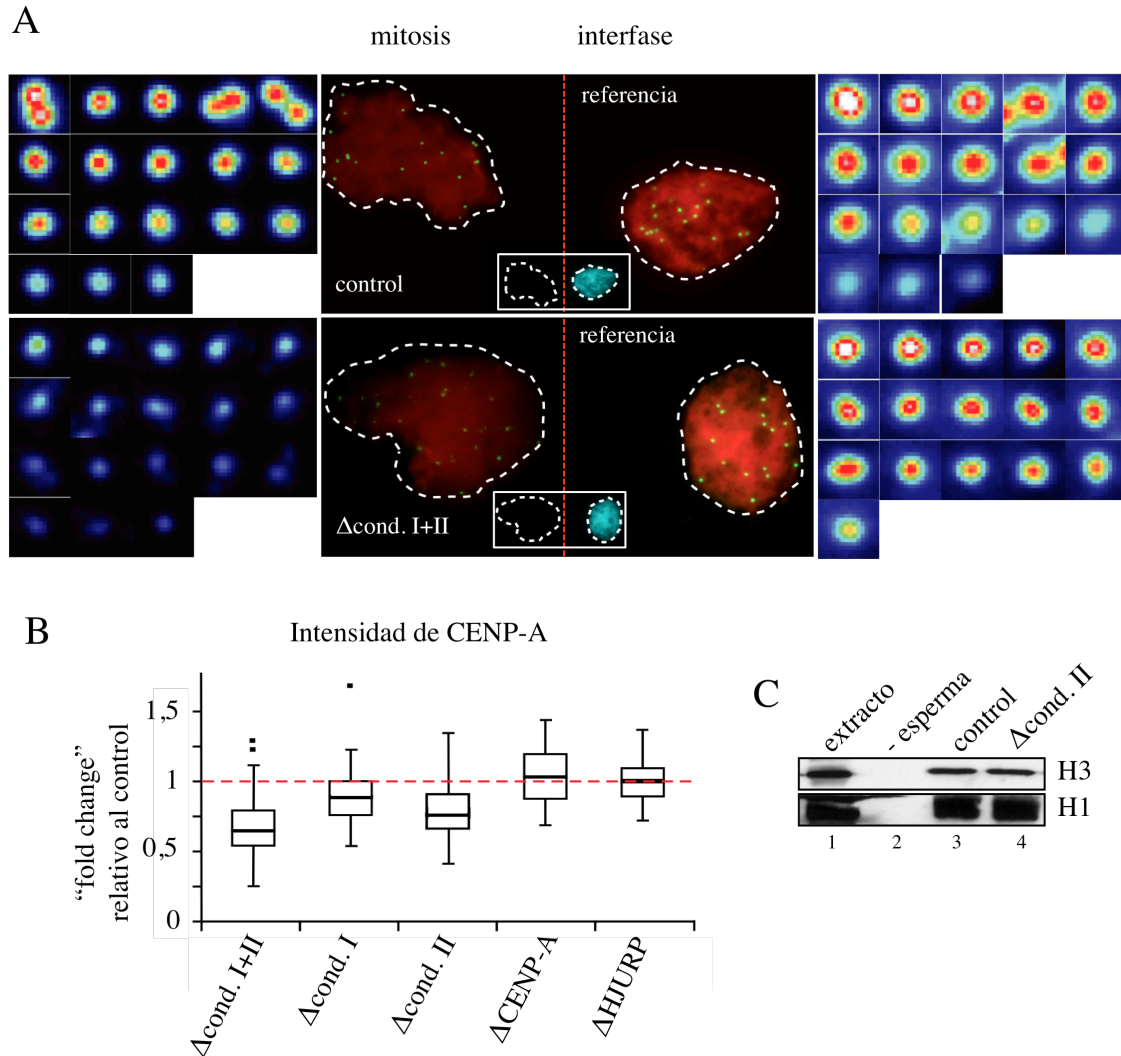


**Figura 15. Condensina II se acumula en la región centromérica.** (A) Esquema representativo de la composición de los complejos condensina I y condensina II de *Xenopus*. (B) Masas de cromosomas mitóticos teñidos con un anticuerpo específico de condensina I (anti-XCAP-G) o condensina II anti-XCAP-H2 (verde), anti-CENP-A (rojo), como marcador del centrómero, y DAPI (azul). (C) Eliminación de condensina I (carril 6), condensina II (carril 7) o ambas (carril 8) de extractos mitóticos. Se toman alícuotas de 1,5 µl de extracto y se compara con una escalera de extracto control (carriles 1-5), expresada en porcentaje, en la que 1,5 µl equivale al 100%, y se analiza por inmunoblot con anticuerpos frente a una de las subunidades específicas de condensina I (XCAP-G), una de condensina II (XCAP-D3) y una común (XCAP-E), y CENP-A. Como control de carga se muestran los niveles de RbAp48.

### Condensina II estabiliza los nucleosomas CENP-A en mitosis e interfase.

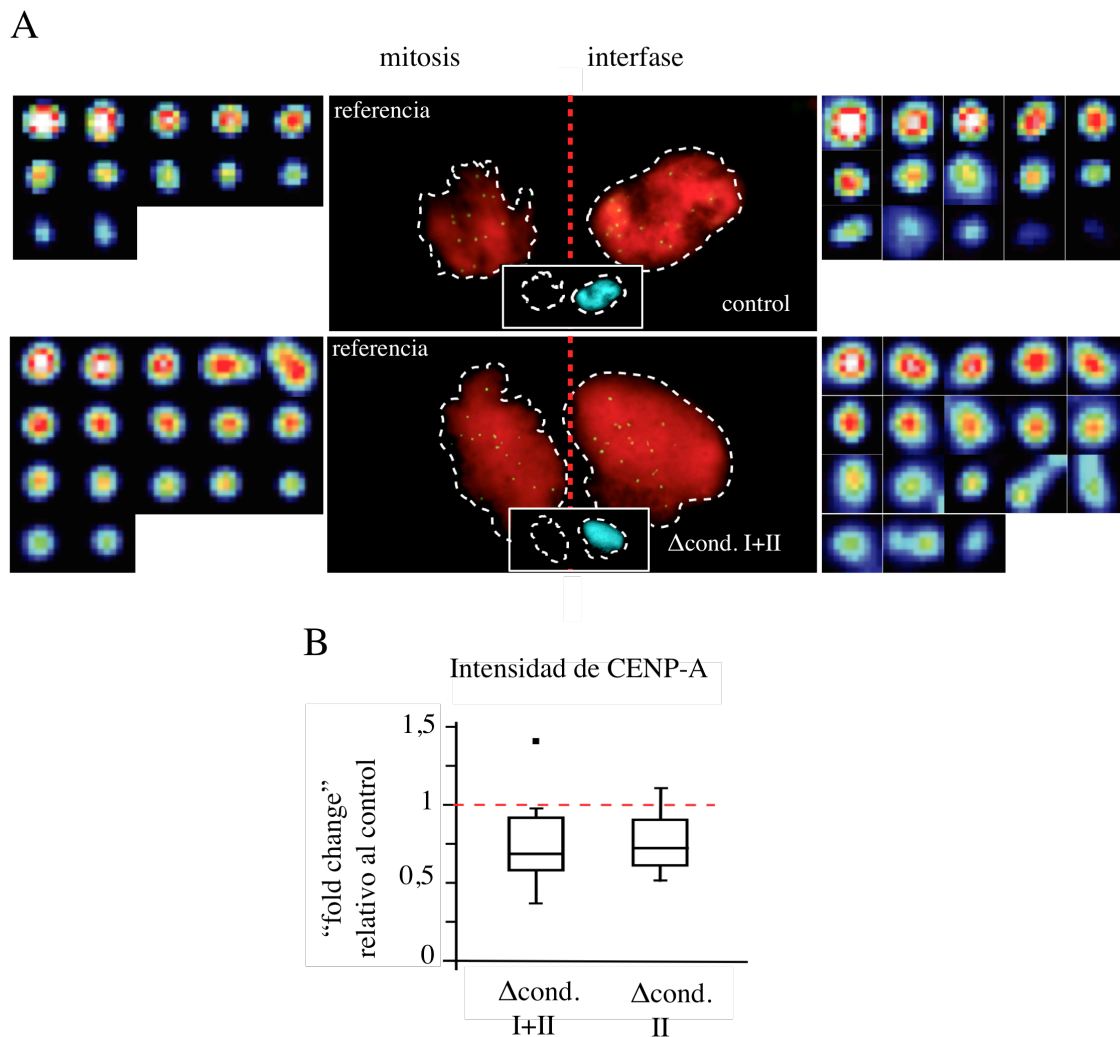
Para estudiar el papel de condensina en el centrómero, en primer lugar analizamos el efecto que produce su ausencia en la estabilidad de los nucleosomas CENP-A presentes en la cromatina centromérica durante mitosis. Para ello medimos la intensidad de CENP-A en cromosomas ensamblados en extractos CSF en los que se ha eliminado previamente uno o ambos complejos, como muestra de referencia utilizamos núcleos en interfase de extractos control (Figura 16A). Cada valor se relativiza a 1, que es el valor adjudicado a la muestra control. Observamos que la

eliminación simultánea de ambas condensinas causa una disminución significativa de la intensidad de CENP-A en el centrómero (Figura 16B). En ausencia de sólo condensina I la señal se reduce bastante menos, en tanto que el efecto es mayor si eliminamos selectivamente condensina II. Como control de la especificidad de condensina en este proceso medimos la intensidad de CENP-A en cromosomas ensamblados en extractos carentes de CENP-A y de XHJURP, un factor asociado al centrómero del que se habla más adelante. No se detectan diferencias en estas muestras con respecto a extractos control (Figura 16B).



**Figura 16. Condensina II estabiliza los nucleosomas CENP-A en el centrómero durante mitosis.** (A) Imagen representativa de una masa de cromosomas mitóticos ensamblados en extractos control (panel superior) o carentes de ambas condensinas (panel inferior), junto a un núcleo en interfase usado como referencia. La señal de CENP-A aparece en verde y el ADN está teñido con DAPI (rojo) y la replicación se sigue por la incorporación de biotina-dUTP (azul verdoso). A ambos lados de la imagen central se muestran imágenes individuales a mayor magnificación de cada uno de los centrómeros que se observan en cada núcleo coloreados como en la Figura 4. (B) Gráfico que muestra la intensidad de CENP-A en cromosomas mitóticos en ausencia de los factores indicados con respecto a extractos control. (C) Fracciones de cromatina de una reacción de ensamblaje en extractos control (carril 3) y carentes de condensina II (carril 4) se analizan mediante inmunoblot con anticuerpos frente a las histonas H3 y H1 (control de carga). Como control se analiza también una muestra de cromatina de una reacción de ensamblaje en ausencia de esperma (carril 2) y una alícuota de extracto (carril 1).

Como se muestra en la Figura 11, durante mitosis no hay incorporación de CENP-A, por lo que la disminución de la señal de CENP-A que observamos, probablemente, se debe a una pérdida de nucleosomas CENP-A presentes inicialmente en la cromatina de esperma. Por tanto, parece que el complejo condensina, puede que especialmente condensina II, está implicado en el mantenimiento de los nucleosomas CENP-A en la región centrómerica durante mitosis. Además, el análisis por inmunoblot de fracciones de cromatina procedentes de extractos con y sin condensina II muestra que la cantidad de histona H3 no se ve alterada (Figura 16C), lo que sugiere que condensina II estabiliza específicamente nucleosomas CENP-A, no nucleosomas que contienen H3.

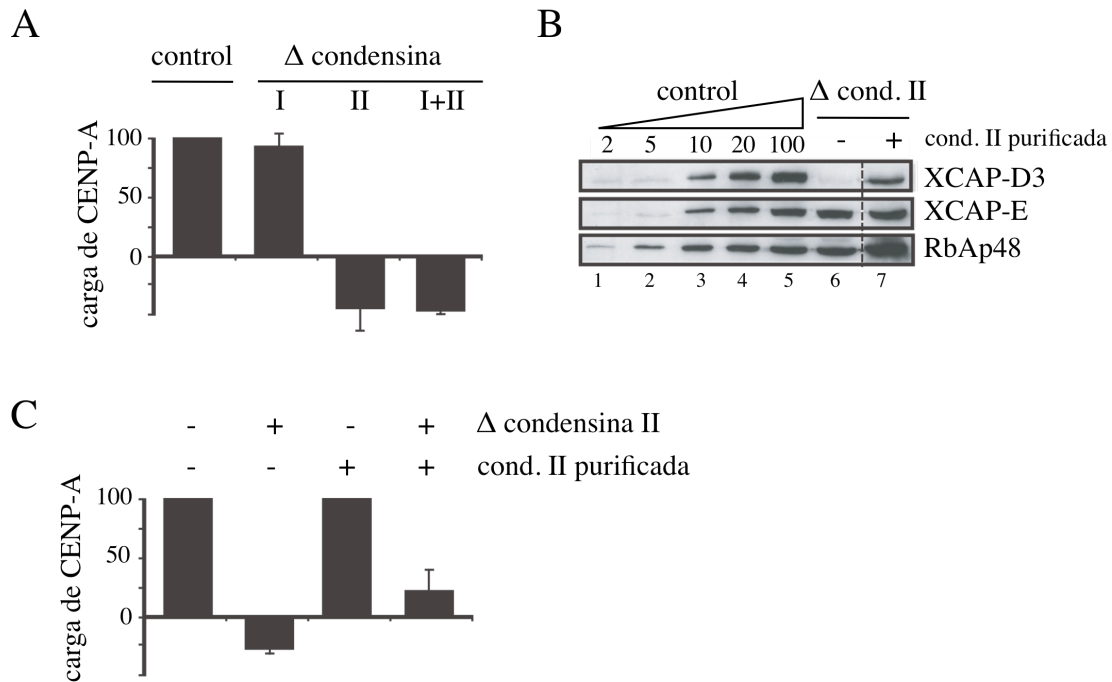


**Figura 17. Condensina II estabiliza los nucleosomas CENP-A en interfase.** (A) Imagen representativa de una masa de cromosomas mitóticos usados como referencia junto a un núcleo interfásico ensamblados en extracto control (panel superior) o extracto carente de condensina I y II (panel inferior). La replicación del ADN se visualiza mediante incorporación de dUTP (azul, inserción en el centro de la imagen). Las ampliaciones a ambos lados de la imagen muestran la intensidad de CENP-A siguiendo el código de colores explicado en la figura 2. (B) Gráfico que muestra la intensidad de CENP-A en núcleos interfásicos carentes de ambas condensinas o sólo condensina II con respecto a núcleos control. En ausencia de condensina II, la intensidad de CENP-A disminuye y este defecto es equivalente a la eliminación simultánea de ambas condensinas.

A continuación, comprobamos si la reducción de condensina II afecta también a la retención de nucleosomas CENP-A en la cromatina interfásica. Para diferenciar entre esta función y un posible efecto sobre la carga de CENP-A, medimos la cantidad de CENP-A en núcleos ensamblados directamente en extracto interfásico, sin paso previo por mitosis. Como se mostraba en la Figura 14, en estas circunstancias no hay incorporación de CENP-A en cromatina. Medimos la intensidad de CENP-A en núcleos control o carentes de una o ambas condensinas, con respecto a una referencia externa, en este caso cromosomas mitóticos (Figura 17A). Al igual que en mitosis, se observa una reducción significativa de la intensidad de CENP-A en ausencia de condensina II. Este defecto no aumenta al eliminar conjuntamente condensina I y II, lo que sugiere que condensina II tiene un papel predominante en la retención de nucleosomas CENP-A en la cromatina centromérica también en interfase (Figura 17B).

### **La función de Condensina II es necesaria para la carga de CENP-A.**

A continuación investigamos el efecto de la eliminación de condensina sobre la carga de CENP-A. Como la incorporación de CENP-A ocurre en interfase, en todos los ensayos de carga que se muestran de aquí en adelante comparamos directamente núcleos en interfase (replicados) con muestras de cromosomas ensamblados en CSF. Se calcula la relación entre la intensidad de CENP-A en los núcleos interfásicos con respecto a los cromosomas mitóticos y el valor obtenido se relativiza con respecto a un porcentaje de 100%, asignado a la muestra control. Este porcentaje es el que finalmente se representa como carga de CENP-A. En ausencia de condensina I, la carga de CENP-A no se ve afectada (Figura 18A). En ausencia de condensina II o de ambas condensinas, la carga de CENP-A alcanza valores negativos, lo que sugiere que, además del problema de retención descrito en el apartado anterior, existe un defecto muy grave en la incorporación de nueva CENP-A. Para confirmar que este defecto se debe a la eliminación de condensina II y no a la de algún factor inespecífico, llevamos a cabo un experimento de rescate. El complejo condensina II se purificó por afinidad de extractos CSF y se añadió a un extracto del que se había eliminado dicho complejo. Los anticuerpos utilizados en cada caso son distintos, si bien ambos reconocen la subunidad XCAP-D3 (Figura 18B). Al repetir el ensayo de carga se obtiene en efecto un rescate, si bien éste es moderado (Figura 18C). Esto puede deberse a que la cantidad de proteína que añadimos de vuelta equivale sólo a un 30% de los niveles endógenos de condensina II en el extracto, y es posible que no toda ella esté activa. En cualquier caso, podemos concluir que la condensina II no sólo contribuye a retener a los nucleosomas CENP-A presente en la cromatina centromérica, sino que es también fundamental para la incorporación de nueva CENP-A al inicio de interfase.



**Figura 18. La eliminación de condensina II impide la incorporación de CENP-A en interfase. (A)** Gráfico de barras que muestra la eficiencia de carga de CENP-A en los extractos que se indican. Se miden 15 parejas de núcleos en dos experimentos diferentes. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar (ES). **(B)** Análisis por inmunoblot de alícuotas de 1,5  $\mu$ l de extracto carente de condensina II antes (carril 6) y después de añadir 0,1 volúmenes de complejo condensina II purificado por afinidad (carril 7). Se compara con una escalera de extracto control (carriles 1-5), expresada en porcentaje, en la que 1,5  $\mu$ l equivale al 100% y se analiza con anticuerpos frente a la subunidad de condensina II, XCAP-D3, la subunidad común XCAP-E y RbAp48 como control de carga. **(C)** Gráfico de barras que muestra la eficiencia de carga de CENP-A en extractos control y carentes de condensina II en los que se ha añadido o no condensina II exógena. Se miden 15 parejas de núcleos en dos experimentos diferentes. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar (ES).

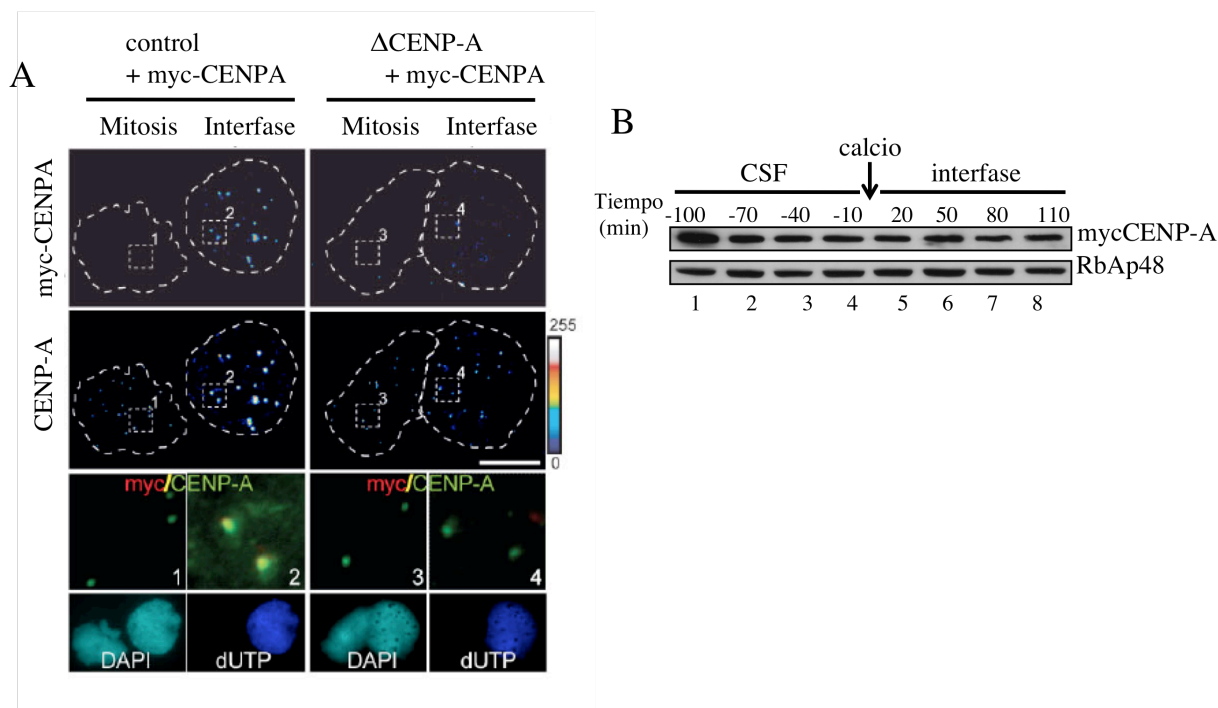
#### 5.4 Función y regulación de XHJURP:

##### La proteína humana HJURP funciona en extractos de *Xenopus*.

Como se muestra en la Figura 18, la función de condensina II es esencial para la carga de CENP-A. Sin embargo, no es probable que este complejo medie directamente esta incorporación. La siguiente pregunta que nos planteamos fue si CENP-A se deposita de forma pasiva en la cromatina centromérica o existe algún factor esencial para su carga. Cabe señalar que la eliminación de los extractos de los complejos CAF-1 e HIRA, encargados de depositar en cromatina nucleosomas que contienen histona H3.1 y H3.3, respectivamente, no afecta significativamente a la carga de CENP-A (datos no mostrados). Por otro lado, cuando se elimina CENP-A del extracto soluble y se intenta rescatar el defecto de carga que esta eliminación origina añadiendo proteína exógena, myc-CENPA, se observa lo siguiente: en tanto que myc-CENPA se incorpora en los centrómeros durante interfase en extractos control, como muestra su



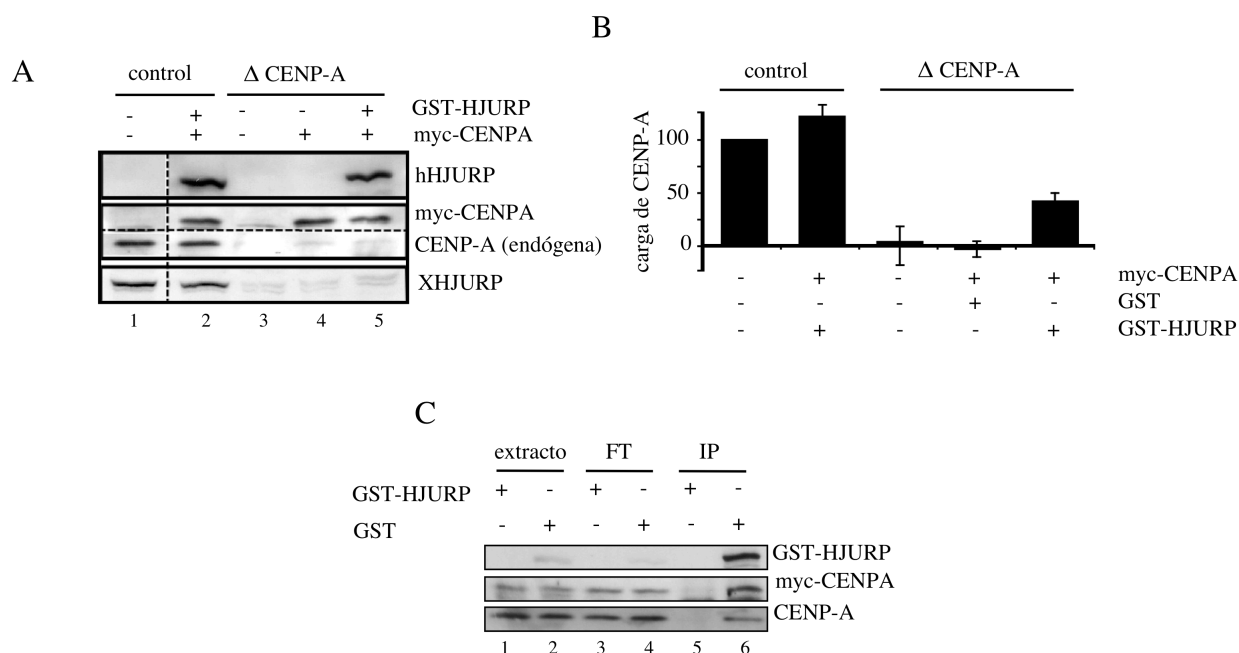
co-localización con la CENP-A endógena, no hay incorporación en los extractos sin CENP-A endógena soluble (Figura 19A). El defecto no es debido a la inestabilidad de myc-CENPA ya que está presente en el extracto durante todo el tiempo que dura la reacción de ensamblaje (Figura 19B).



**Figura 19. La adición de CENP-A exógena no rescata el defecto de carga en extractos sin CENP-A endógena soluble (A)** Imágenes representativas de una masa de cromosomas mitóticos junto a un núcleo interfásico ensamblados bien en extracto control, bien en extracto sin CENP-A endógena, ambos conteniendo myc-CENPA, teñidos con anti-myc y anti-CENPA. Las imágenes muestran la intensidad de la señal siguiendo el código de colores explicado de la Figura 4. En la parte inferior se muestran imágenes magnificadas de los centrómeros (numerados). **(B)** Se toman alícuotas del extracto sin CENP-A endógena al que se ha añadido myc-CENPA a diferentes tiempos a lo largo de la reacción de ensamblaje de cromatina y se analizan mediante inmunoblot con anti-myc y anti-RbAp48 (control de carga).

Este resultado nos llevó a pensar que la eliminación de CENP-A estaba eliminando a la vez algún factor esencial para su incorporación. Al tiempo que realizábamos estos experimentos se publicaron dos estudios proponiendo que la proteína HJURP actúa como una chaperona específica de CENP-A en células humanas, esencial para su incorporación en cromatina (Dunleavy et al., 2009, Foltz et al., 2009). Decidimos probar si esta proteína era capaz de promover la carga de myc-CENPA en extractos sin CENP-A endógena añadiendo proteína recombinante GST-HJURP (Figura 20A). De acuerdo con el experimento que se muestra en la figura anterior, en ausencia de CENP-A endógena apenas hay carga de CENP-A aunque se añada myc-CENPA exógena (Figura 20B). Sin embargo, si junto con myc-CENPA añadimos GST-HJURP, la eficiencia de carga se rescata parcialmente, acercándose al 50% con respecto a

extractos control. Además, el análisis de los inmunoprecipitados que se obtienen con anti-GST revela que esta proteína humana interacciona directamente con myc-CENPA y CENP-A endógena (Figura 20C). Es por tanto probable que exista un homólogo de HJURP en *Xenopus*, esencial para la carga de CENP-A en el centrómero, y que se encuentre asociado a la CENP-A soluble en el extracto, de modo que ambos sean eliminados simultáneamente.

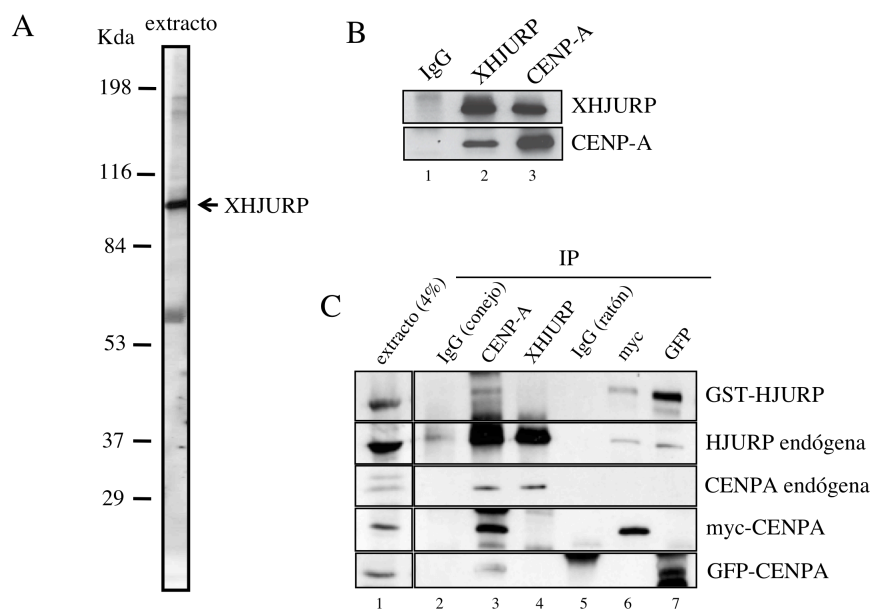


**Figura 20. La proteína humana HJURP promueve la carga de myc-CENPA.** (A) Análisis de inmunoblot de los extractos utilizados en los ensayos de carga de CENP-A que se presentan en (B) con anticuerpos anti-hHJURP, anti-myc, anti-CENPA y anti-XHJURP. (B) Gráfico de barras que muestra la eficiencia de carga de CENP-A en dichos extractos. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar (ES). Se miden 15 parejas de núcleos en dos experimentos diferentes. (C) Análisis por inmunoblot de una reacción de inmunoprecipitación con anticuerpo anti-GST a partir de un extracto que contiene GST (carril 5) o GST-HJURP (carril 6). Se incluye una alícuota de extracto (1.5% , carriles 1 y 2) y la fracción de proteínas no unidas al anticuerpo (*flow through*, FT), carriles 3 y 4).

### CENP-A y XHJURP forman un complejo en extractos de *Xenopus*.

Un análisis bioinformático sugiere la existencia de un homólogo de HJURP en *X. tropicalis* (Sánchez-Pulido 2009), por lo que generamos un anticuerpo utilizando como antígeno un fragmento de dicha proteína. Este anticuerpo reconoce (Figura 21A) e inmunoprecipita de extractos de huevos de *X. laevis* una proteína de aproximadamente 100 kDa (Figura 21B). CENP-A está presente en el inmunoprecipitado que se obtiene con anti-XHJURP y viceversa, XHJURP aparece en los inmunoprecipitados que se obtienen con anti-CENPA (Figura 21B). Además, extractos en los que se ha eliminado CENP-A muestran también niveles muy reducidos de XHJURP (Figura 20A). Estos resultados indican que, como sospechábamos,

ambas proteínas forman complejo en el extracto. Para determinar la estequiometría de este complejo, añadimos a un extracto GST-HJURP, myc-CENPA y GFP-CENPA y analizamos mediante inmunoprecipitación las interacciones que se establecen. El anticuerpo que reconoce CENP-A inmunoprecipita la proteína endógena y las dos versiones marcadas de CENP-A exógenas, así como GST-HJURP y XHJURP (Figura 21C, carril 3). Tanto myc-CENPA como GFP-CENPA interactúan con GST-HJURP y XHJURP pero no entre sí ni con CENP-A endógena (Figura 21C, carriles 6 y 7). Parece por tanto que una sola molécula de CENP-A se une a una molécula de HJURP. Por otra parte, HJURP endógena no interactúa con GST-HJURP y se asocia preferentemente a la CENP-A endógena en lugar de a GFP-CENPA o myc-CENPA (Figura 21C, carril 4).

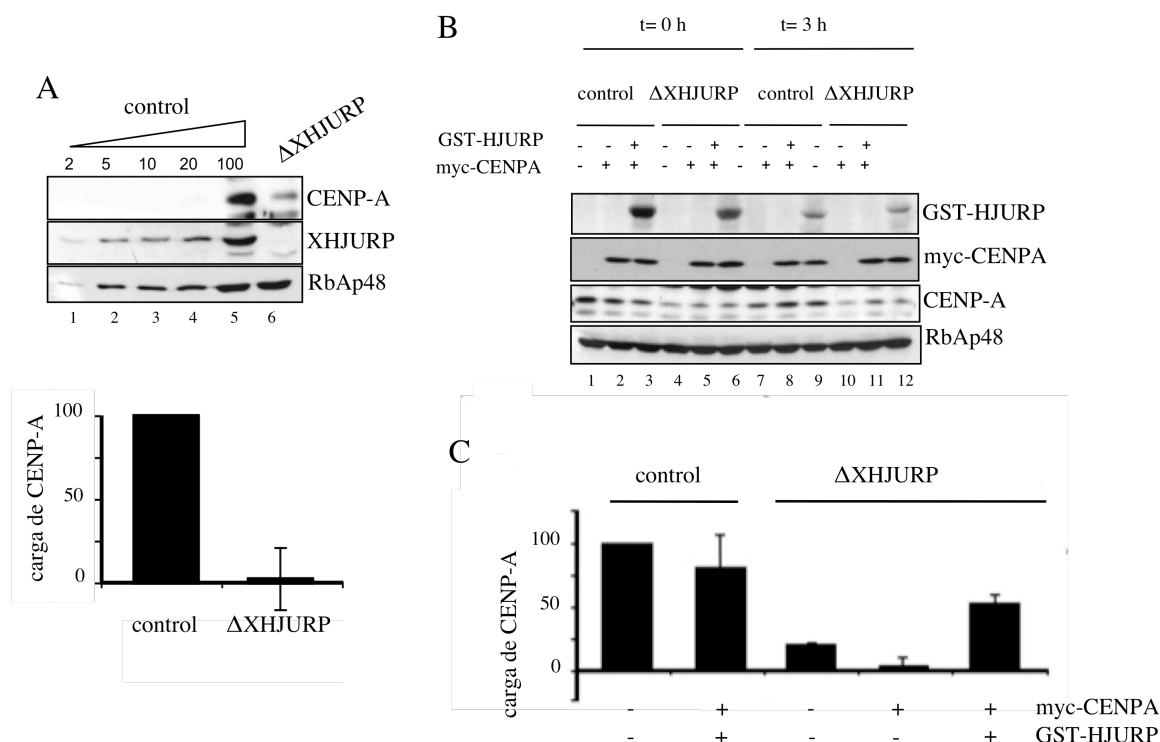


**Figura 21. CENP-A forma complejo con XHJURP en el extracto.** (A) Análisis por inmunoblot de una alícuota de extracto mitótico con anti-XHJURP. (B) Reacciones de inmunoprecipitación con IgGs de conejo como control y anticuerpos frente a XHJURP y CENP-A. (C) Análisis por inmunoblot de inmunoprecipitados (IP) obtenidos con los anticuerpos que se indican de un extracto en el que se ha añadido myc-CENPA, GFP-CENPA y GST-HJURP. Se analiza también una alícuota de extracto (4%, carril 1).

### **XHJURP es esencial para la incorporación de CENP-A.**

Cuando se elimina XHJURP del extracto usando el anticuerpo anteriormente mencionado, la carga de CENP-A se reduce drásticamente (Figura 22A). Puesto que la reducción de los niveles de XHJURP en más de un 98% reduce simultáneamente los niveles de CENP-A soluble en más del 50% (Figura 22A, carril 6), repetimos el ensayo de carga añadiendo myc-CENPA para restablecer dichos niveles y así poder descartar que el defecto se deba a la poca cantidad de CENP-A soluble. En ausencia XHJURP la proteína exógena myc-CENP-A es estable en el

extracto durante todo el experimento (Figura 22B) pero no hay incorporación de nueva CENP-A (Figura 22C). Sin embargo, al añadir GST-HJURP junto con myc-CENPA, el defecto de carga se recupera un 54%. Estos resultados indican que la función de HJURP como factor de carga de CENP-A en cromatina está conservada en *X. laevis*.

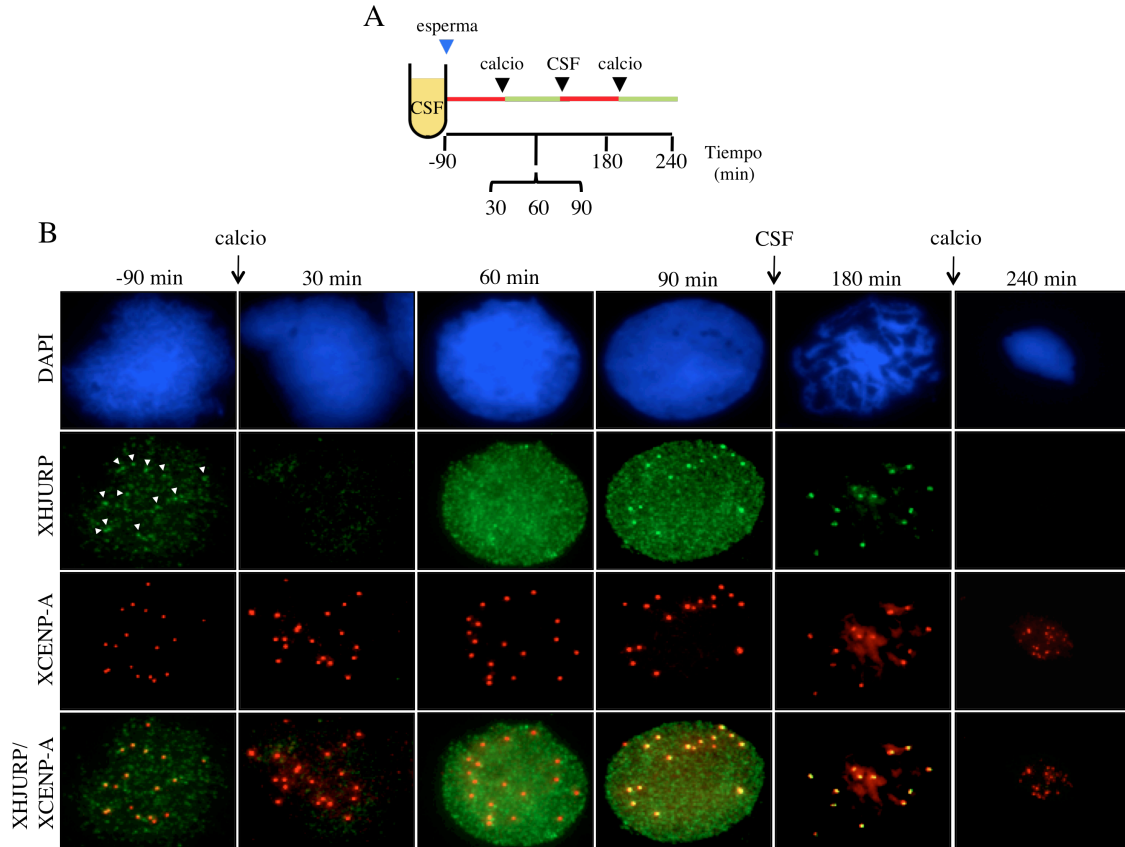


**Figura 22. La función de HJURP como chaperona de CENP-A está conservada en *X. laevis*.** (A) Análisis por inmunoblot de cantidades crecientes de un extracto control (expresada en porcentaje) y un extracto sin XHJURP que se utilizan en el ensayo de carga cuyo resultado se muestra en la parte inferior. Como control de carga se muestran los niveles de RbAp48. Las barras del gráfico representan la media  $\pm$  error estándar después de analizar 15 parejas de núcleos en dos experimentos diferentes. (B) Análisis por inmunoblot de alícuotas de 1,5  $\mu$ l de extracto control (carriles 1-3 y 7-9) y carente de XHJURP (carriles 4-6 y 10-12) a los que se ha añadido o no myc-CENPA y/o GST-HJURP, tomadas al inicio y final del experimento. (C) Gráfico de barras que muestra la eficiencia de carga de CENP-A en los extractos que se indican. Se miden 15 parejas de núcleos de cada condición en dos experimentos diferentes. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar.

### Localización de XHJURP a lo largo del ciclo celular.

A continuación, analizamos la localización de XHJURP a lo largo del ciclo celular. Para ello, llevamos a cabo la reacción de ensamblaje esquematizada en la Figura 23A y tomamos muestras a diferentes tiempos para su análisis mediante inmunofluorescencia. En cromosomas ensamblados en extracto CSF se detecta una señal débil de XHJURP en algunos de los centrómeros, como muestra su co-localización con CENP-A (flechas en la muestra “-90 min”,

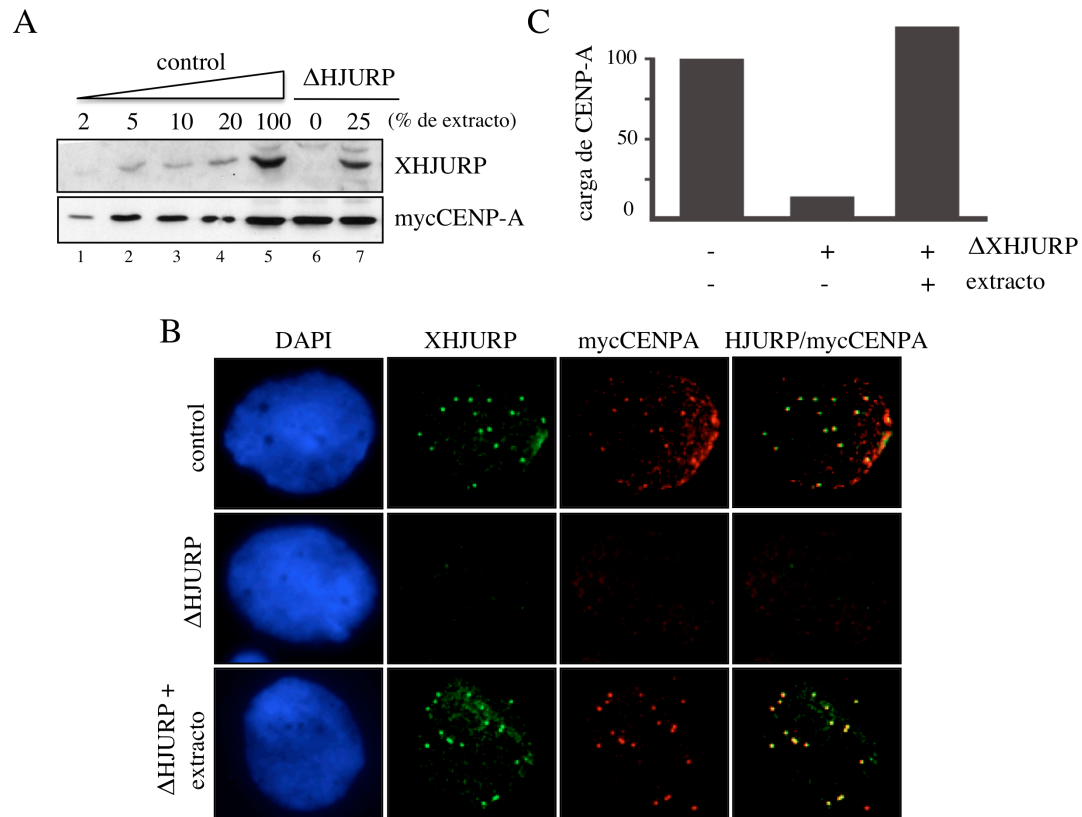
Figura 23B). Tras la adición de calcio, esta señal desaparece por completo (muestra “30 min”). Tras 60 min de incubación en interfase se observa la asociación de XHJURP por toda la cromatina, pero a partir de los 90 min, XHJURP se acumula de forma apreciable en todos los centrómeros de los núcleos en interfase. Esta señal permanece al convertir el extracto a mitosis por la adición de CSF (“180 min”) y desaparece de nuevo al comienzo de una nueva interfase (muestra “240” min).



**Figura 23. Localización de XHJURP a lo largo del ciclo celular.** (A) Esquema de la reacción de ensamblaje y de los tiempos a los que se toman muestras para su análisis por inmunofluorescencia. Las flechas negras indican adiciones al extracto. (B) Imágenes representativas del análisis inmunofluorescencia de dichas muestras con anticuerpos frente a XHJURP (verde) y CENP-A (rojo). El ADN se tiñe con DAPI (azul). XHJURP se detecta en algunos de los centrómeros de cromosomas ensamblados en extracto CSF pero se acumula preferentemente en la región centromérica durante interfase y la siguiente mitosis.

Esta localización sugiere que XHJURP no forma parte del nucleosoma centromérico final, pudiendo actuar de forma enzimática. Para comprobar esta posibilidad, medimos la eficiencia de carga de CENP-A en un extracto con sólo el 25% de los niveles normales de XHJURP. Para ello, añadimos un cuarto de extracto control (en el que no se ha eliminado ninguna proteína) a un extracto carente de XHJURP (Figura 24A). En estas condiciones, myc-

CENPA se incorpora en cromatina de forma similar a como lo hace en núcleos del extracto control (Figura 24B) y la carga de CENP-A se recupera por completo (Figura 24C).

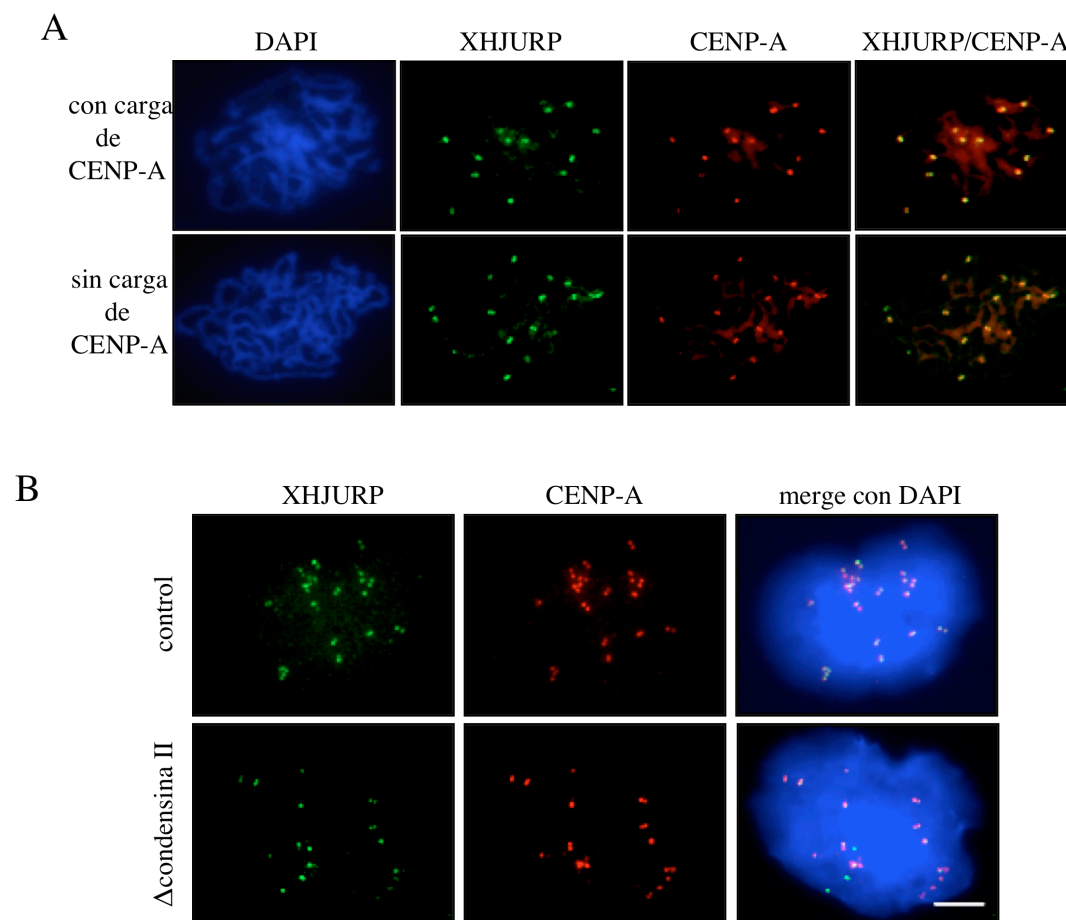


**Figura 24. Cantidades subestequiométricas de XHJURP reestablecen la carga de CENP-A.** (A) Análisis por inmunoblot de alícuotas de 1,5  $\mu$ l de extracto en el que se ha eliminado XHJURP (carril 6) o extracto en el que se ha añadido un 25% de extracto control (carril 7), ambos en presencia de myc-CENP-A. Se comparan con una escalera de extracto control (carriles 1-5), expresada en porcentaje, en la que 1,5  $\mu$ l representa el 100% y se analizan con anticuerpos anti-XHJURP y anti-myc. (B) Núcleos interfásicos ensamblados en extractos control y sin XHJURP, a los que se ha añadido o no un 25% de extracto control, se fijan y tiñen con anti-XHJURP (verde), anti-myc (rojo) y DAPI (azul). (C) Gráfico de barras que muestra la eficiencia de carga de CENP-A en las mismas condiciones que en B. Se miden 15 parejas de núcleos por condición.

### Regulación de la localización de XHJURP.

La cuestión que nos planteamos a continuación es qué dirige la asociación de HJURP a los centrómeros. Como se muestra en la Figura 23, XHJURP se concentra en la región centromérica al final de interfase, una vez pasado el momento de incorporación de CENP-A, por lo que es posible que la nueva CENP-A promueva la unión de XHJURP. Sin embargo, cuando ensamblamos núcleos mediante la adición de espermia directamente a un extracto en interfase, condición en la que no hay carga de CENP-A, la localización de XHJURP no se ve afectada (Figura 25A). Otra posibilidad es que HJURP reconozca la región centromérica a través de

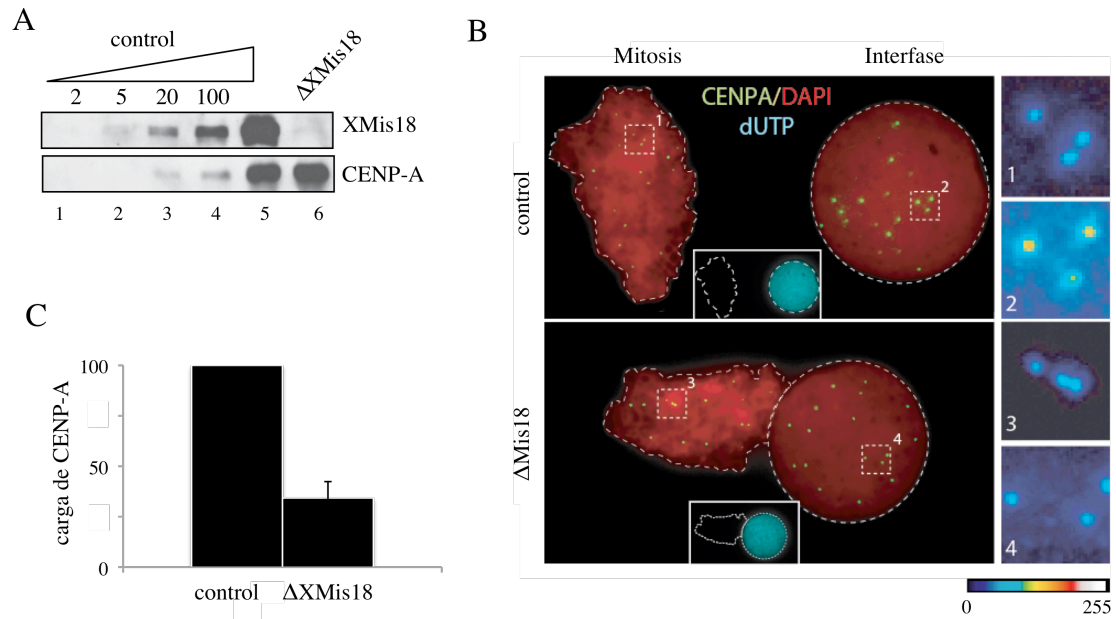
condensina II pero, de nuevo, núcleos interfásicos ensamblados en extractos sin condensina II muestran una localización normal de XHJURP (Figura 25B).



**Figura 25. La localización centromérica de XHJURP no depende de CENP-A o condensina II.** (A) Cromosomas mitóticos ensamblados en condiciones en las que hay carga de CENP-A (esperma añadido a extracto mitótico) o sin carga de CENP-A (esperma añadido a extracto interfásico) se fijan y tiñen con anti-XHJURP (verde) y anti-CENPA (rojo). El ADN se tiñen con DAPI (azul). (B) Cromosomas mitóticos ensamblados en extracto control o sin condensina II se fijan y tiñen como en A. Barra 10  $\mu$ m.

En células humanas y en levaduras, la proteína Mis18 es esencial para la incorporación de CENP-A, aunque no interacciona físicamente con ella. Esta proteína aparece en los centrómeros de células humanas durante un período breve del ciclo celular, en la transición de mitosis a la fase G1. Se ha sugerido que Mis18 no media directamente la incorporación de CENP-A sino que promueve la unión a los centrómeros de otros factores asociados a ella, como puede ser el caso de HJURP. Para comprobar esta hipótesis, generamos un anticuerpo frente al homólogo de Mis18 en *Xenopus* con el que estudiar la función de esta proteína. Empleando este anticuerpo, eliminamos el 90% de XMis18 del extracto sin afectar a los niveles de CENP-A

(Figura 26A). En estas condiciones, la eficiencia de carga de CENP-A se reduce casi un 70% (Figura 26B y C).



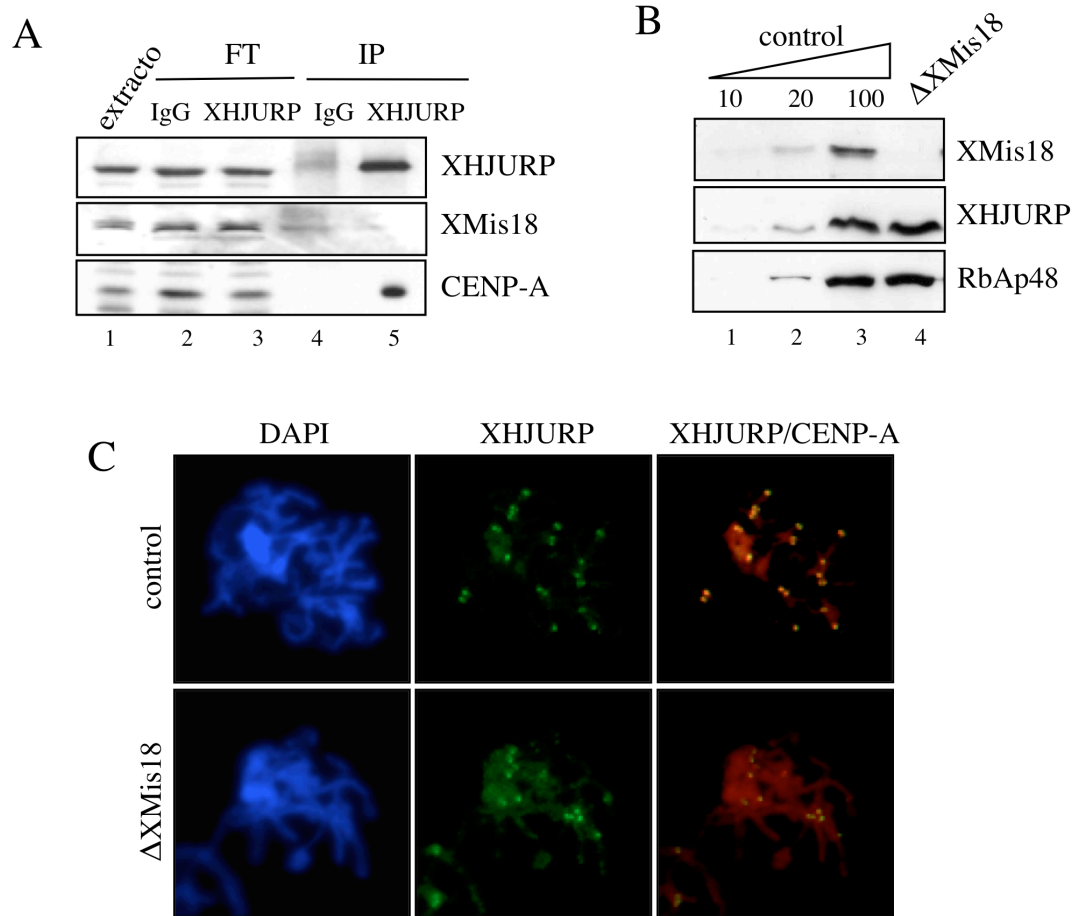
**Figura 26. La función de Mis18 está conservada en *X. laevis*.** (A) Eliminación de XMis18 de extracto mitótico. Se toma una alícuota de 1,5  $\mu$ l de extracto carente de XMis18 (carril 6) y se compara con una escalera de extracto control (carriles 1-4), expresada en porcentaje, en la que 1,5  $\mu$ l equivale al 100%, mediante inmunoblot con anticuerpos frente a XMis18 y CENP-A (B) Imagen representativa de una masa de cromosomas mitóticos junto a un núcleo interfásico ensamblados en extracto control (panel superior) y extracto carente de XMis18 (panel inferior). Ambos tipos de núcleos se procesan juntos para inmunofluorescencia y se tiñen con anti-CENPA (verde). El ADN se tiñe con DAPI (azul). (C) Gráfico de barras que muestra la eficiencia de carga de CENP-A en ausencia de XMis18. Se miden 15 parejas de núcleos en 4 experimentos independientes. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar (ES).

A continuación, estudiamos la relación entre XMis18 y XHJURP. XMis18 no aparece en los precipitados de XHJURP (Figura 27A) y la eliminación de XMis18 no afecta a los niveles de XHJURP en el extracto (Figura 27B), indicando que las dos proteínas no se asocian, al menos fuera de la cromatina. Al analizar mediante inmunofluorescencia si la localización de XHJURP en la región centromérica depende de XMis18, observamos que cromosomas mitóticos ensamblados en extracto carente de XMis18 presentan una acumulación normal de XHJURP en los centrómeros (Figura 27C).

Si bien estos experimentos muestran que la función de Mis18 es importante para la carga de CENP-A, el defecto que observamos es menor que cuando se elimina XHJURP o condensina II. Además, no hemos sido capaces de detectar Mis18 en el centrómero ni con nuestro anticuerpo ni tras añadir al extracto la proteína exógena myc-Mis18 (datos no mostrados). Es posible que las herramientas con las que contamos actualmente para analizar su mecanismo de acción en el sistema de *Xenopus* no sean apropiadas o que en este sistema



embrionario la función de Mis18 sea más difícil de apreciar. Por ello, decidimos llevar a cabo el análisis de Mis18 en células humanas en cultivo.



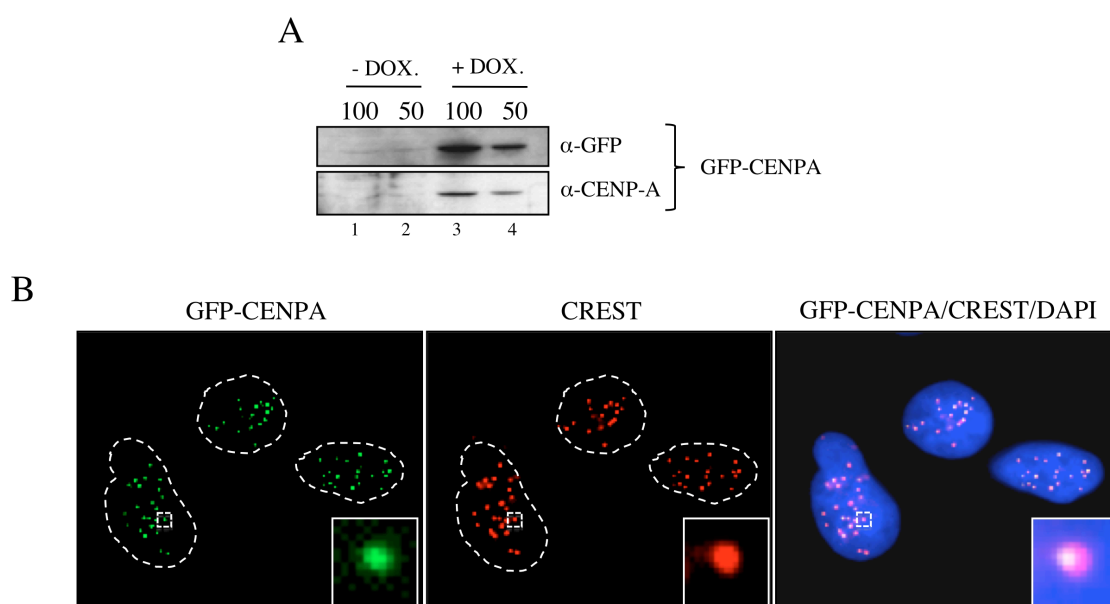
**Figura 27. La localización centromérica de XHJURP no depende de XMis18.** (A) Reacciones de inmunoprecipitación obtenidas con IgGs de conejo (carril 4) y anticuerpo anti-XHJURP (carril 5) se analizan mediante inmunoblot con anticuerpos anti-XHJURP, anti-XMis18 y anti-CENP-A. Se incluye una alícuota de extracto (4%, carril 1) y de la fracción de proteínas no unidas al anticuerpo (FT, carril 2 y 3). (B) Análisis por inmunoblot de una alícuota (1,5 ul) de un extracto tras la eliminación de XMis18 (carril 4) y de cantidades crecientes de extracto control (carriles 1-3), expresada en porcentaje, en la que 1,5 ul equivale al 100%. Como control de carga se muestran los niveles de RbAp48. (C) Cromosomas mitóticos ensamblados en extracto control y sin XMis18 se fijan y tiñen con anti-XHJURP (verde), anti-CENPA (rojo) y DAPI (azul).

## Parte II. Estudio de la incorporación de CENP-A en células humanas en cultivo.

### 5.5 Regulación espacio-temporal de la carga de CENP-A en células humanas:

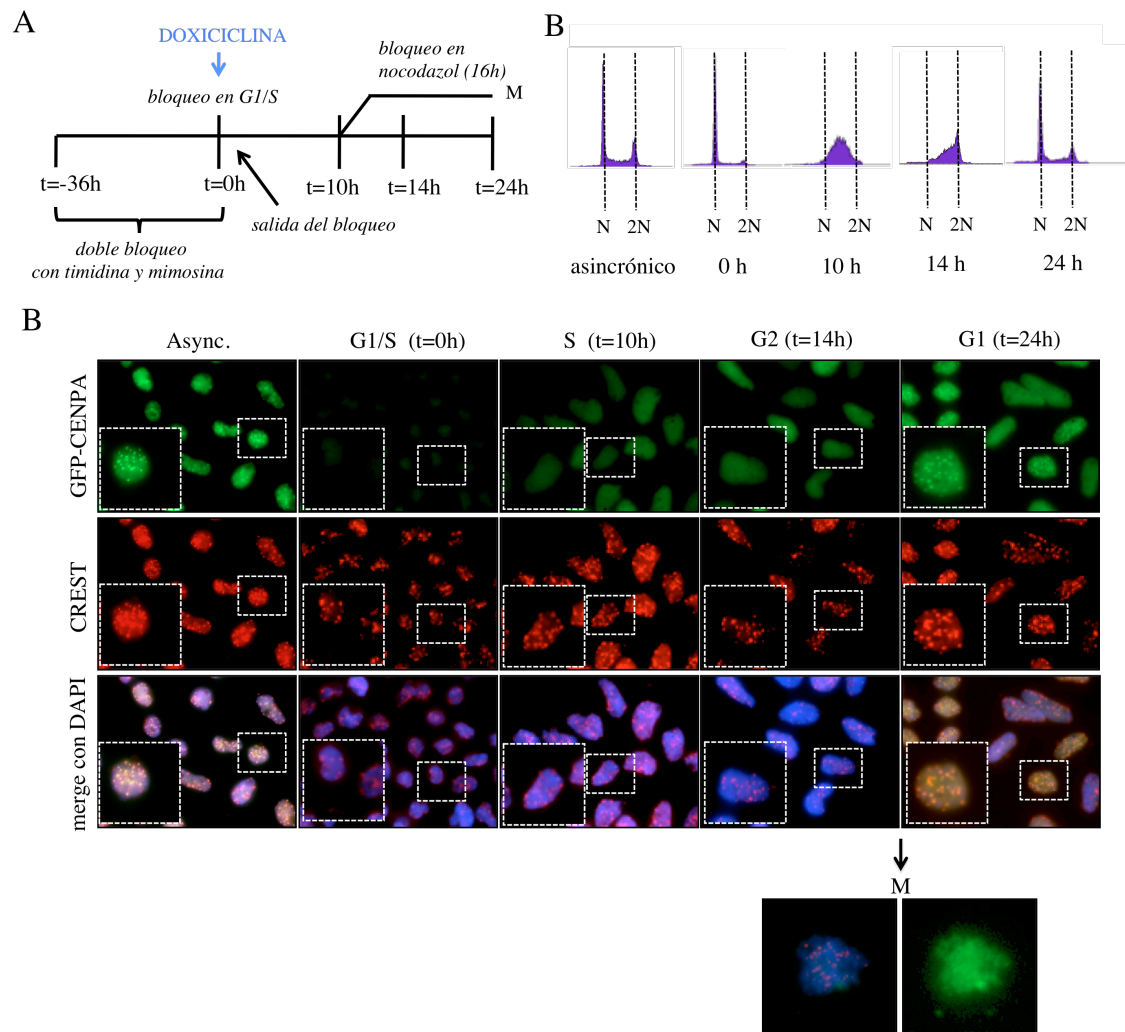
#### Caracterización de una línea celular estable que expresa GFP-CENPA.

Con el objeto de estudiar el efecto de la eliminación de posibles factores implicados en el mecanismo de incorporación de CENP-A en el contexto de una célula somática, desarrollamos una línea celular que expresa de forma estable una versión marcada de CENP-A, GFP-CENPA. De esta forma, podemos distinguir entre la proteína endógena, presente ya en los centrómeros, y la de reciente incorporación. La expresión de esta proteína está regulada por el promotor de la tetraciclina, de forma que sólo en presencia de doxiciclina, un análogo de la tetraciclina, en el medio de cultivo, ocurre la síntesis de la proteína (Figura 28A). La correcta localización centromérica de GFP-CENPA se comprobó por inmunofluorescencia empleando CREST como marcador del cinetocoro (Figura 28B). CREST es un suero obtenido de pacientes con enfermedades autoinmunes que reconoce las proteínas CENP-A, CENP-B y CENP-C (Kremer et al., 1998).



**Figura 28. Expresión y localización de GFP-CENPA.** (A) Análisis por inmunoblot de extractos totales de células 293 que expresan GFP-CENPA de forma inducible tras el tratamiento (carriles 3 y 4) o no (carriles 1 y 2) con doxiciclina para la expresión de GFP-CENPA (B) Células en interfase expresando GFP-CENPA (verde) durante 24h se fijan tras pre-extracción con detergente para eliminar las proteínas solubles y se tiñen con suero CREST (rojo). El ADN se tiñe con DAPI (azul).

Para estudiar el momento de incorporación de GFP-CENPA, sincronizamos las células parándolas en la transición entre las fases G1 y S mediante el protocolo que se describe en la Figura 29A. Al tiempo que se elimina del medio de cultivo la droga que causa esta parada para restablecer la progresión del ciclo celular, se añade doxiciclina para inducir la expresión de GFP-CENPA. Se toman muestras a diferentes tiempos para su análisis mediante citometría de flujo (Figura 29B) e inmunofluorescencia (Figura 29C). Observamos que la incorporación de GFP-CENPA en los centrómeros tiene lugar en la fase G1 del ciclo celular y que por tanto, esta proteína se comporta de forma similar a la CENP-A endógena. Sin embargo, también vemos que durante las fases S, G2 y M (mitosis), una fracción de GFP-CENPA aparece distribuida por toda la cromatina.

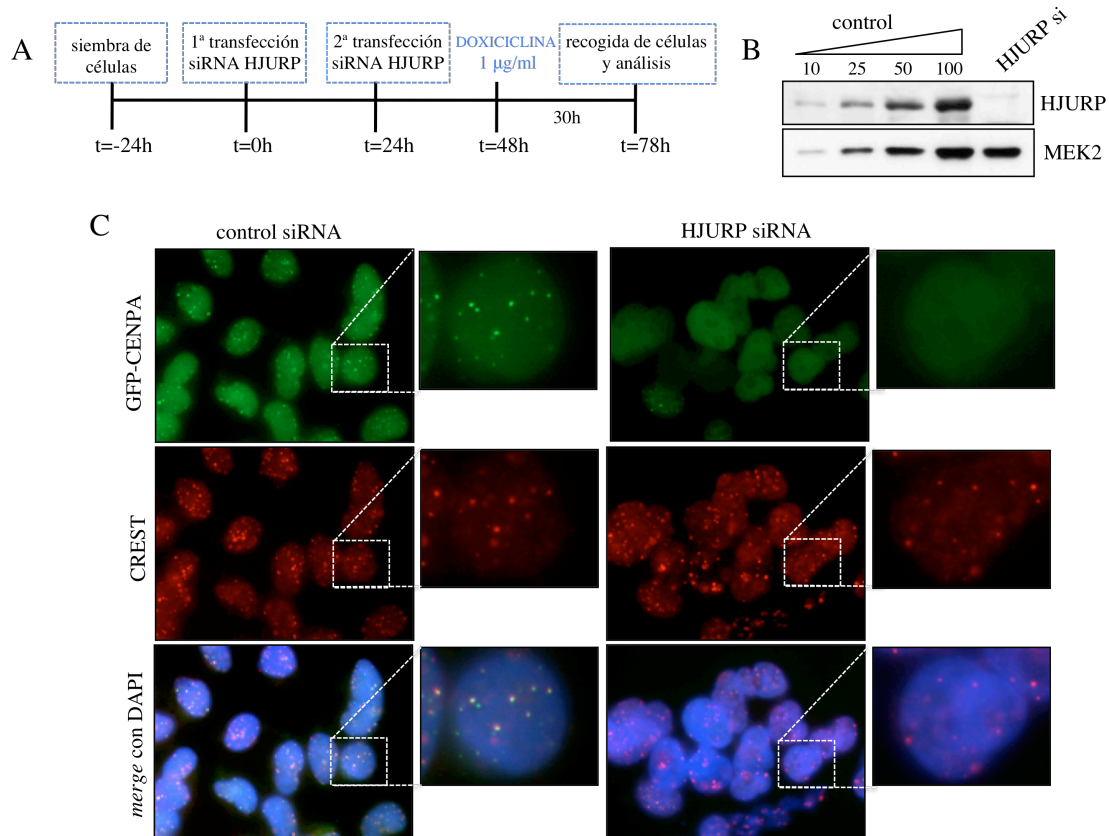


**Figura 29. La incorporación centromérica de GFP-CENPA tiene lugar al comienzo de fase G1.** (A) Esquema que muestra el procedimiento seguido para el análisis del momento de incorporación de GFP-CENPA. (B) Perfiles de citometría de flujo de las muestras que se analizan mediante inmunofluorescencia en (C) indicando el contenido en ADN, lo que da idea de la fase del ciclo celular en que se encuentran. (C) Imágenes de inmunofluorescencia de las muestras de células tomadas en los tiempos que se indican, preextraídas con detergente para visualizar únicamente la fracción de proteínas unida a cromatina, fijadas y teñidas con suero CREST (rojo) y DAPI (azul). GFP-CENPA se acumula en los centrómeros al inicio de G1.

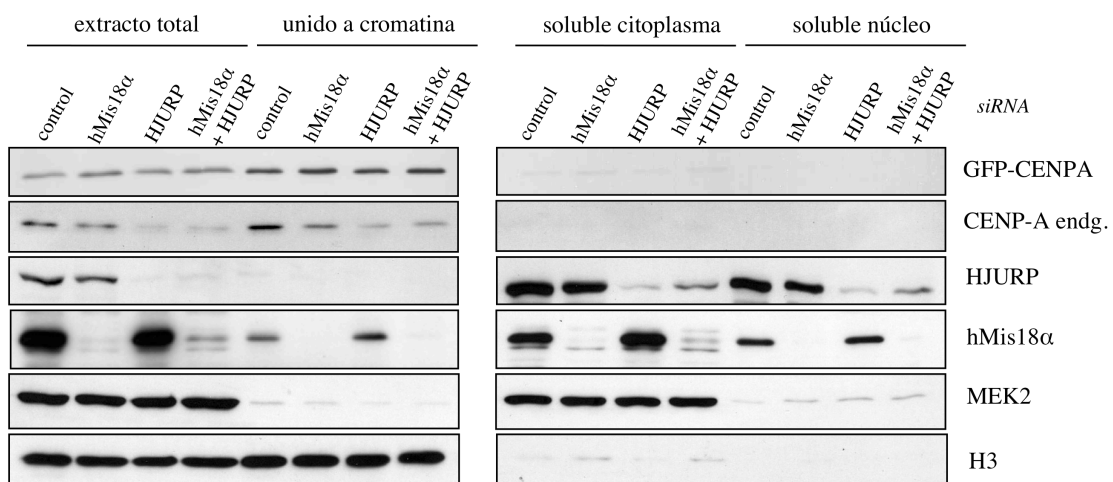
A continuación, comprobamos si la incorporación de GFP-CENPA está regulada por los mismos mecanismos que la proteína endógena y por tanto, es una herramienta útil para nuestro estudio. Para ello, analizamos la carga de GFP-CENPA en los centrómeros tras reducir los niveles de HJURP, la chaperona específica de CENP-A, mediante ARN interferente (ARNi). Como se indica en el esquema de la Figura 30A, la inducción con doxiciclina se mantiene por un período de 30h para permitir que todas las células pasen, al menos una vez, por el momento de incorporación de CENP-A al inicio de G1 en presencia de GFP-CENPA. La reducción de los niveles de HJURP es superior al 90% (Figura 30B) y en estas circunstancias no hay carga de nueva CENP-A en los centrómeros, en tanto que la carga sí tiene lugar en las células control que tienen niveles normales de HJURP (Figura 30C). Concluimos por tanto que la incorporación de GFP-CENPA a los centrómeros depende de HJURP.

### **La incorporación de GFP-CENPA en cromatina no centromérica no depende de HJURP.**

En el experimento que se acaba de describir se observa que, aún en ausencia de HJURP, una fracción de GFP-CENPA se incorpora por toda la cromatina. Como se describe en un apartado posterior, ocurre lo mismo en ausencia de Mis18 (Figura 35). Un fraccionamiento bioquímico de células asincrónicas que expresan GFP-CENPA en presencia de niveles reducidos de HJURP o/y Mis18 confirma este resultado: en tanto que la CENP-A endógena, presente únicamente en la cromatina centromérica, disminuye en células transfectadas con *siRNAs* frente a Mis18, HJURP, o ambos, los niveles en cromatina de GFP-CENPA no varían entre las distintas condiciones (Figura 31, izquierda). Este resultado indica que la incorporación de la GFP-CENPA a la cromatina no centromérica depende de mecanismos diferentes a los que median dicha incorporación en los centrómeros. Además, se observa que la mayor parte de GFP-CENPA se encuentra unida a cromatina, siendo prácticamente indetectable en la fracción soluble (Figura 31, derecha).

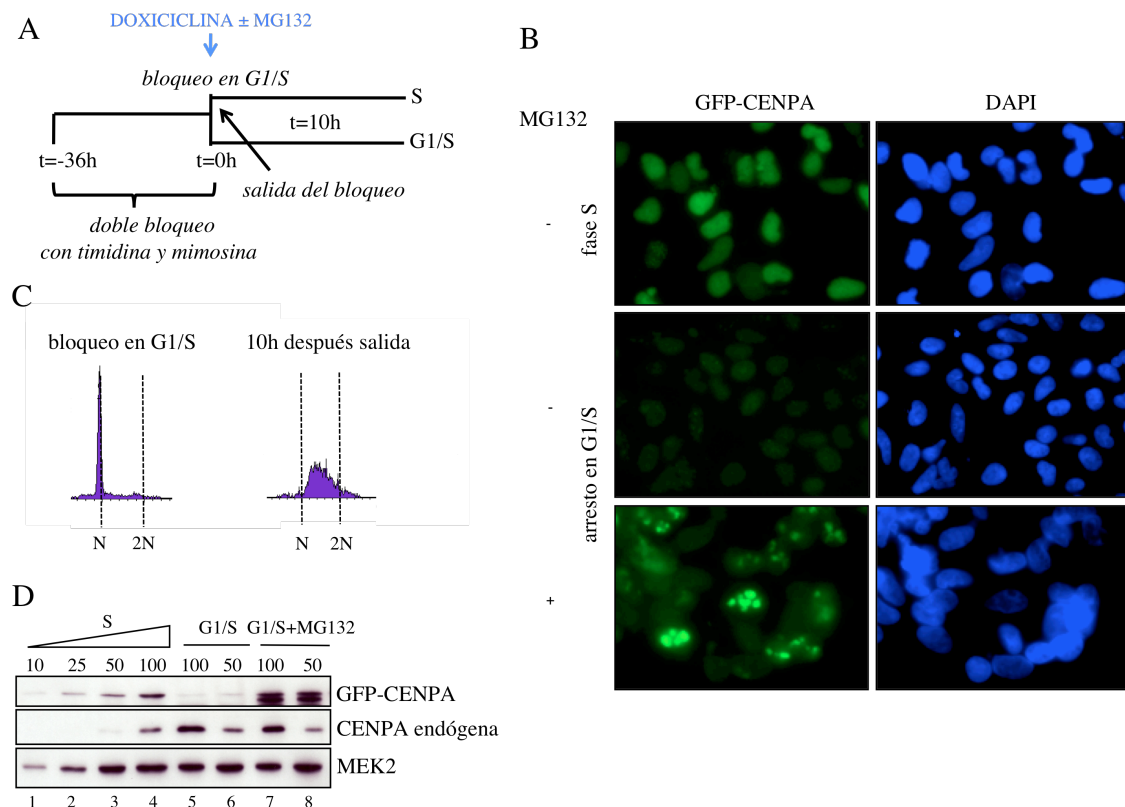


**Figura 30. La incorporación de GFP-CENPA en los centrómeros depende de HJURP.** (A) Esquema del procedimiento seguido para el silenciamiento de HJURP y la detección de GFP-CENPA en los centrómeros. (B) Análisis por inmunoblot de los niveles de HJURP tras su silenciamiento con oligos de *siRNA*. MEK2 se muestra como control de carga. (C) Imágenes de inmunofluorescencia que muestran el defecto de carga de GFP-CENPA en ausencia de HJURP. Las células son preextraídas con detergente y el ADN se tiñe con DAPI (azul). La fluorescencia del GFP (GFP-CENPA) se representa en verde.



**Figura 31. GFP-CENPA se incorpora por toda la cromatina independientemente de Mis18 y HJURP.** Análisis por inmunoblot de la fracción de GFP-CENPA y CENP-A endógena soluble y unida a cromatina en las condiciones indicadas. Se analizan también los niveles remanentes de las proteínas hMis18 $\alpha$  y HJURP tras el silenciamiento con *siRNA*. MEK2, una quinasa citoplasmática, y la histona H3, un componente abundante de la cromatina, se muestran como controles del fraccionamiento bioquímico.

Una posibilidad es que la incorporación generalizada de GFP-CENPA a cromatina ocurra durante la replicación de ADN. Cuando analizamos mediante inmunofluorescencia la presencia de GFP-CENPA en la cromatina de células que han finalizado la fase S y células bloqueadas en la transición G1/S, ambas tras 10h en medio con doxiciclina (Figura 32A), observamos que sólo las primeras han incorporado GFP-CENPA (Figura 32B). Las células que no han replicado aún su ADN (ver perfil de FACS en la Figura 32C) no sólo no incorporan GFP-CENPA en cromatina sino que los niveles totales de GFP-CENPA son prácticamente indetectables mediante inmunoblot (Figura 32D, carriles 5 y 6). En cambio, si añadimos al medio de cultivo el inhibidor del proteasoma MG132, los niveles de GFP-CENPA se recuperan (Figura 32D, carriles 7 y 8). Estos resultados sugieren que GFP-CENPA soluble es degradada por el proteasoma cuando las células están paradas en la transición G1/S. Es posible que este proceso proteolítico esté activo durante buena parte del ciclo, pues como se muestra en la Figura 31, es muy difícil detectar GFP-CENPA en las fracciones solubles.

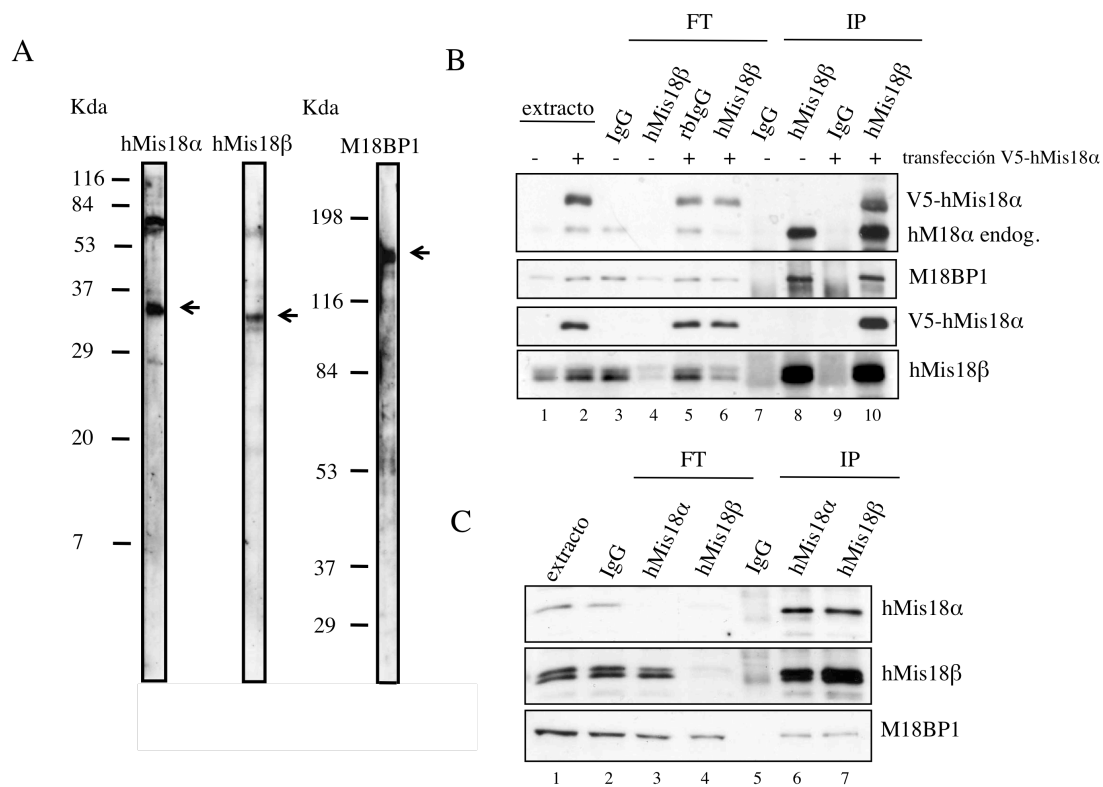


**Figura 32. GFP-CENPA es inestable durante el bloqueo en G1/S.** (A) Esquema del experimento (B) Imágenes de inmunofluorescencia de células expresando GFP-CENPA (verde) tratadas o no con el inhibidor del proteasoma, MG132. Las células se preextraen con detergente para visualizar únicamente la fracción de proteína unida a cromatina. El ADN se tiñe con DAPI (azul). (C) Perfiles de citometría de flujo mostrando el contenido en ADN de células paradas en G1/S y células que han sido liberadas 10h después del arresto. (D) Análisis por inmunoblot de extractos totales de células arrestadas en G1/S sin tratar o tratadas con MG132, y cantidades crecientes de un extracto de células en fase S. Se emplean anticuerpos frente a CENP-A, para detectar tanto GFP-CENPA como CENP-A endógena y MEK2, como control de carga.

## 5.6 Función del complejo hMis18 en la incorporación de CENP-A:

### El complejo hMis18 $\alpha$ -Mis18 $\beta$ -M18BP1 es fundamental para la carga de CENP-A.

Para llevar a cabo el estudio de la regulación y mecanismo de acción de Mis18 en células humanas, en primer lugar generamos anticuerpos específicos frente a hMis18 $\alpha$ , hMis18 $\beta$  y M18BP1. Estos anticuerpos reconocen proteínas de 31, 29 y 119 kDa, respectivamente, en un extracto total de células HeLa (Figura 33A). El análisis de los inmunoprecipitados obtenidos a partir de extractos totales de células HEK293T con anticuerpo contra hMis18 $\beta$  revela la asociación entre las tres proteínas (Figura 33B). Además, la proteína exógena V5-hMis18 $\alpha$ , expresada en estas células, se une al resto de componentes del complejo y se detecta en los inmunoprecipitados de hMis18 $\beta$ . Igualmente, el análisis de los inmunoprecipitados de hMis18 $\alpha$  y hMis18 $\beta$ , a partir de extractos nucleares de células HeLa, en los que las proteínas de la cromatina han sido solubilizadas por tratamiento con nucleasa micrococcal, también muestra la asociación entre hMis18 $\alpha$ , hMis18 $\beta$  y M18BP1 (Figura 33C).

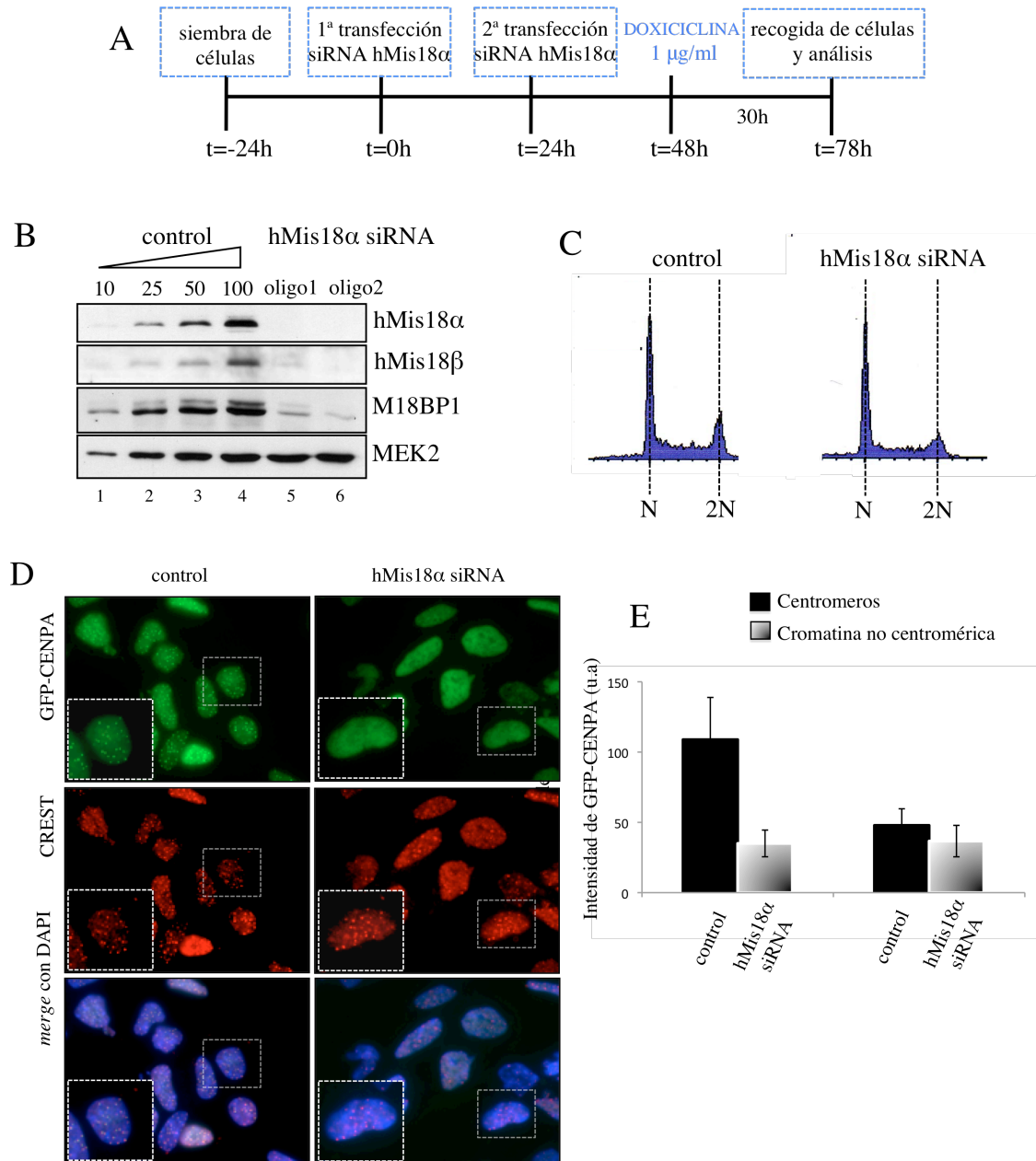


**Figura 33. hMis18 $\alpha$  y hMis18 $\beta$  se asocian a M18BP1 de forma soluble y en cromatina.** (A) Análisis por inmunoblot de alícuotas de un extracto total de células HeLa con anticuerpos frente a hMis18 $\alpha$ , hMis18 $\beta$  y M18BP1. (B) Inmunoprecipitación del complejo hMis18 a partir de extractos totales de células HEK293T que expresan o no la proteína exógena V5-hMis18 $\alpha$  con un anticuerpo anti-hMis18 $\beta$ . Como control se emplean IgGs preinmunes de conejo. Se incluye una alícuota de extracto y la fracción de proteínas no unidas al anticuerpo (carriles 3-6). Los precipitados se analizan con anticuerpos anti-hMis18 $\alpha$ , que reconoce tanto V5-hMis18 $\alpha$  como la proteína endógena, anti-M18BP1, anti-V5 y anti-hMis18 $\beta$ . (C) Inmunoprecipitación del complejo hMis18 a partir de extractos nucleares de células HeLa tratados con nucleasa para extraer las proteínas de la cromatina. Se emplean anticuerpos frente a las subunidades hMis18 $\alpha$  (carril 6) y hMis18 $\beta$  (carril 7) e IgGs preinmunes de conejo (carril 5), como

control. Se incluye una alícuota de extracto (carril 1) y la fracción de proteínas no unidas al anticuerpo (FT). Los precipitados se analizan con los anticuerpos que se indican.

A continuación, evaluamos el efecto de la eliminación de hMis18 mediante ARNi sobre la incorporación de CENP-A empleando la línea celular descrita anteriormente (Figura 34A). El análisis por inmunoblot de los niveles de hMis18 $\alpha$  revela que la eficiencia de reducción es superior al 90% (Figura 34B). Observamos también una disminución clara en los niveles de hMis18 $\beta$  y M18BP1, lo que sugiere que la estabilidad de estas proteínas depende de la formación del heterotrímero. La eliminación de hMis18 no afecta a la progresión del ciclo celular y asumimos, por tanto, que todas las células han pasado por fase G1 a lo largo de las 30 horas de inducción de GFP-CENPA por doxiciplina (Figura 34C). Las imágenes de inmunofluorescencia que se muestran en la Figura 34D y la cuantificación correspondiente (Figura 34E) indican que, en ausencia de hMis18, no hay carga de GFP-CENPA en la región centromérica. Como se mostraba en el apartado anterior, la presencia de GFP-CENPA en cromatina no centromérica no se ve afectada.

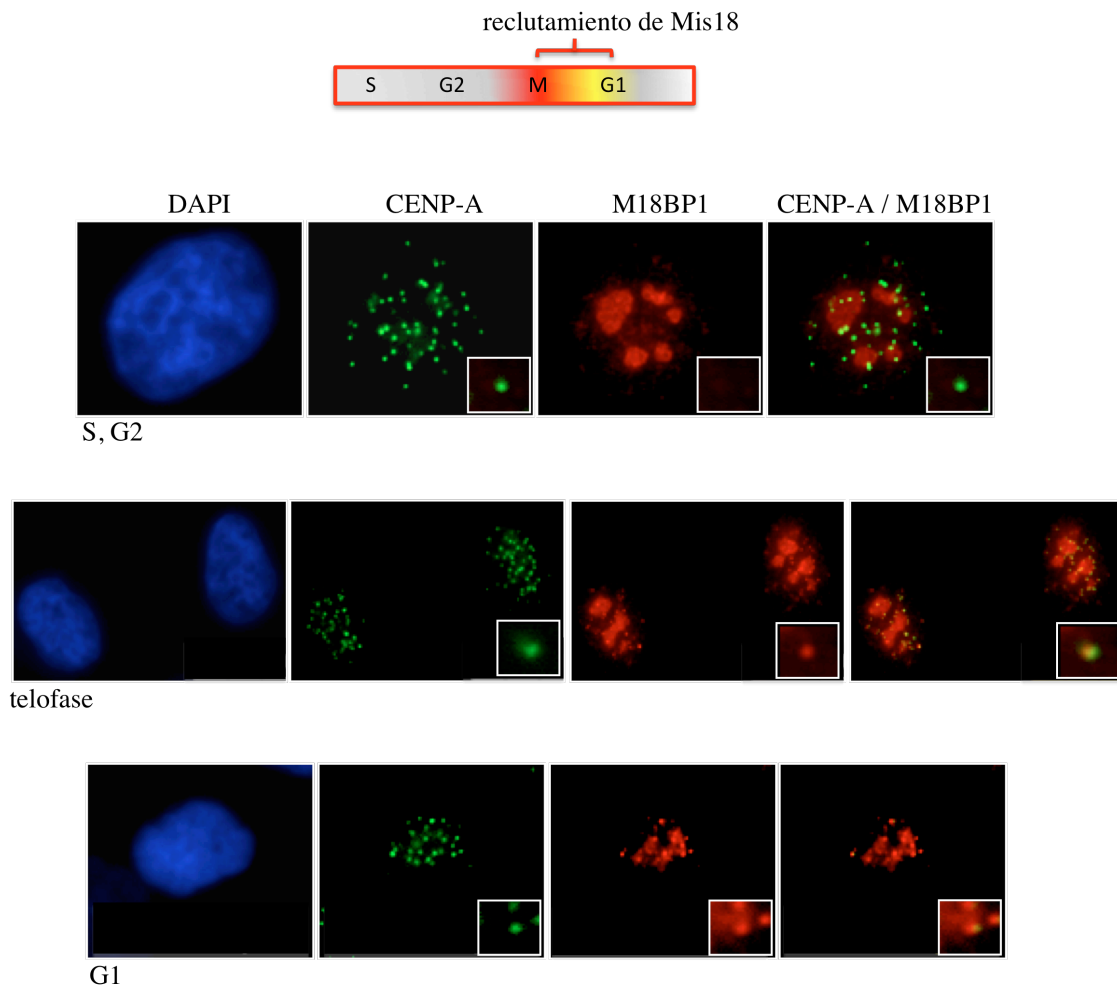




**Figura 34. La eliminación de hMis18 previene la incorporación de GFP-CENPA.** (A) Esquema del procedimiento seguido para analizar el efecto de la eliminación de hMis18 en células que expresan GFP-CENPA. (B) Análisis por inmunoblot de los niveles de hMis18α, hMis18β, M18BP1 y MEK2 (control de carga) en células control o transfectadas con dos *siRNAs* diferentes contra hMis18α. (C) Perfiles de ciclo celular mediante citometría de flujo de células control y tratadas con *siRNAs* contra hMis18α. (D) Imágenes de inmunofluorescencia de estas células que expresan GFP-CENPA (verde), tratadas con detergente antes de la fijación, teñidas con suero CREST (rojo) y DAPI (azul). (E) Cuantificación de la intensidad (u.a., unidades arbitrarias) de la señal de GFP en los centrómeros y en regiones de cromatina no centromérica en al menos 15 células por condición. Las barras indican la media  $\pm$  SD (desviación estandar).

### Regulación de la localización de hMis18.

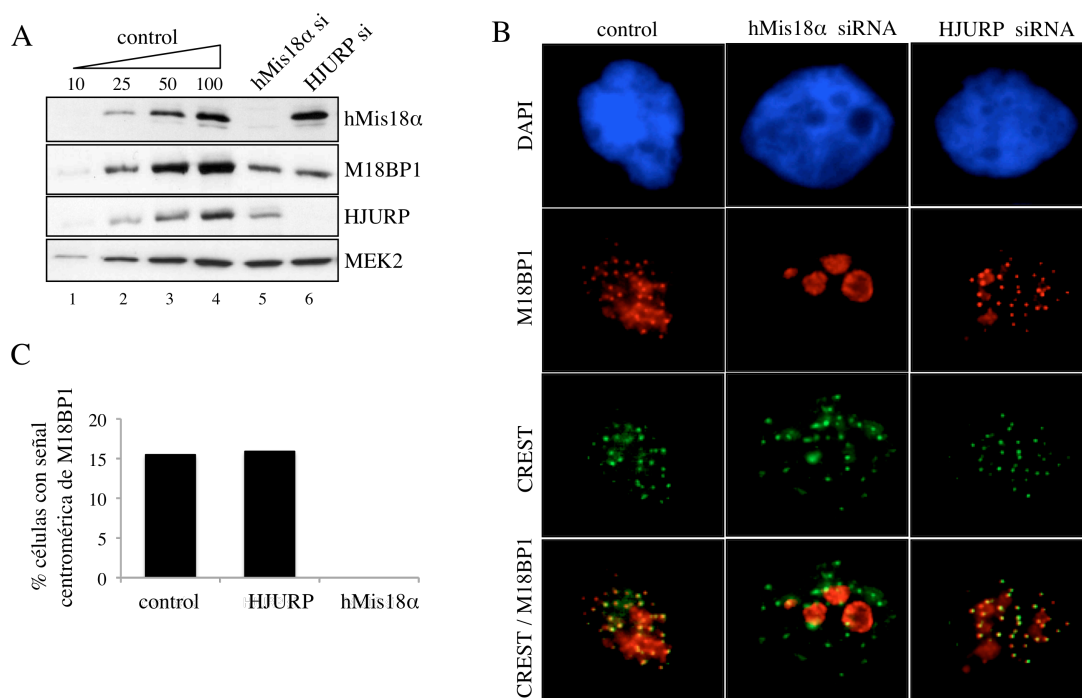
De los anticuerpos generados contra las tres subunidades del complejo Mis18, sólo el que reconoce M18BP1 presenta una señal específica en inmunofluorescencia. Empleando este anticuerpo detectamos M18BP1 en los centrómeros durante telofase y G1 temprana (Figura 35). Además de la señal centromérica, se observa una acumulación de esta proteína en sitios débilmente teñidos con DAPI, que posiblemente corresponden a nucléolos.



**Figura 35. Localización de M18BP1 a lo largo del ciclo celular.** Imágenes representativas de células en cada las fases del ciclo celular indicadas, preextraídas con detergente, fijadas y teñidas con anti-M18BP1 (rojo) y anti-CENPA (verde). El ADN se tiñe con DAPI (azul).

La función de hMis18 en la carga de CENP-A parece depender de su asociación a la región centromérica (Fujita et al., 2007), pero se desconoce qué regula dicha asociación. En células con niveles reducidos de hMis18 $\alpha$ , M18BP1 no se detecta en los centrómeros a pesar de que aún permanece el 25% de esta proteína en la célula (Figura 36). La eliminación de HJURP no afecta a la localización de M18BP1, lo que confirma que hMis18 actúa antes que HJURP en

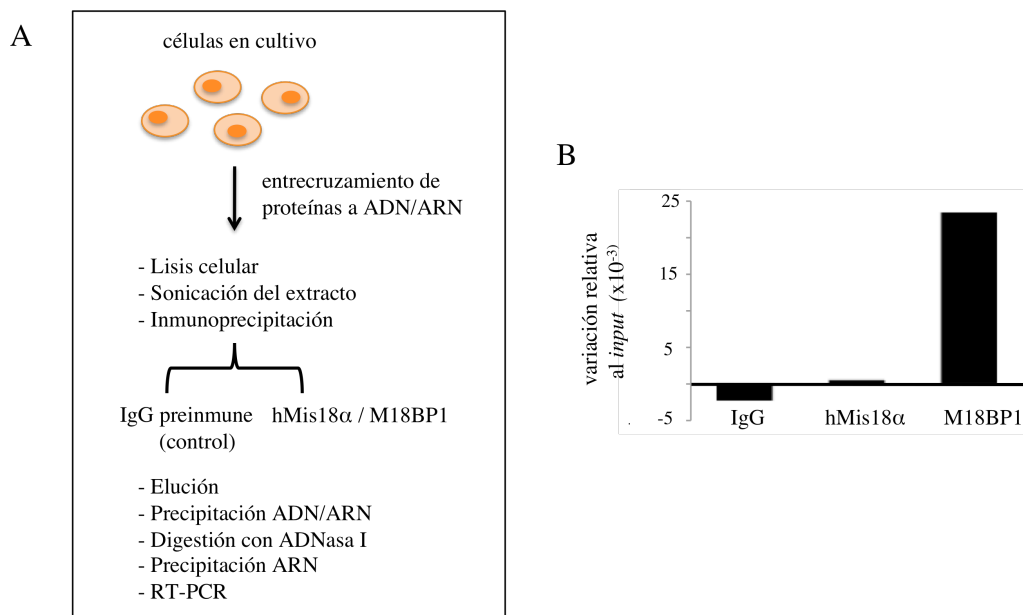
la ruta de incorporación de CENP-A. Este resultado indica que se requieren las tres subunidades del complejo hMis18 para su asociación a cromatina y que ésta es independiente de HJURP.



**Figura 36. La localización centromérica de M18BP1 depende de hMis18α pero no de HJURP.** (A) Análisis por inmunoblot de extractos de células HeLa tratadas con *siRNAs* contra hMis18α (carril 5) y HJURP (carril 6), y cantidades crecientes de un extracto de células control, con los anticuerpos que se indican. Los niveles de MEK2 se muestran como control de carga. (B) Imágenes de inmunofluorescencia de células HeLa control y transfectadas con *siRNAs* contra hMis18α y HJURP, fijadas y teñidas con anti-M18BP1 (rojo) y suero CREST (verde). El ADN se tiñe con DAPI (azul). (C) Gráfico de barras que muestra el porcentaje de células que presentan localización centrómerica de M18BP1 en las condiciones que se indican (200 células por condición).

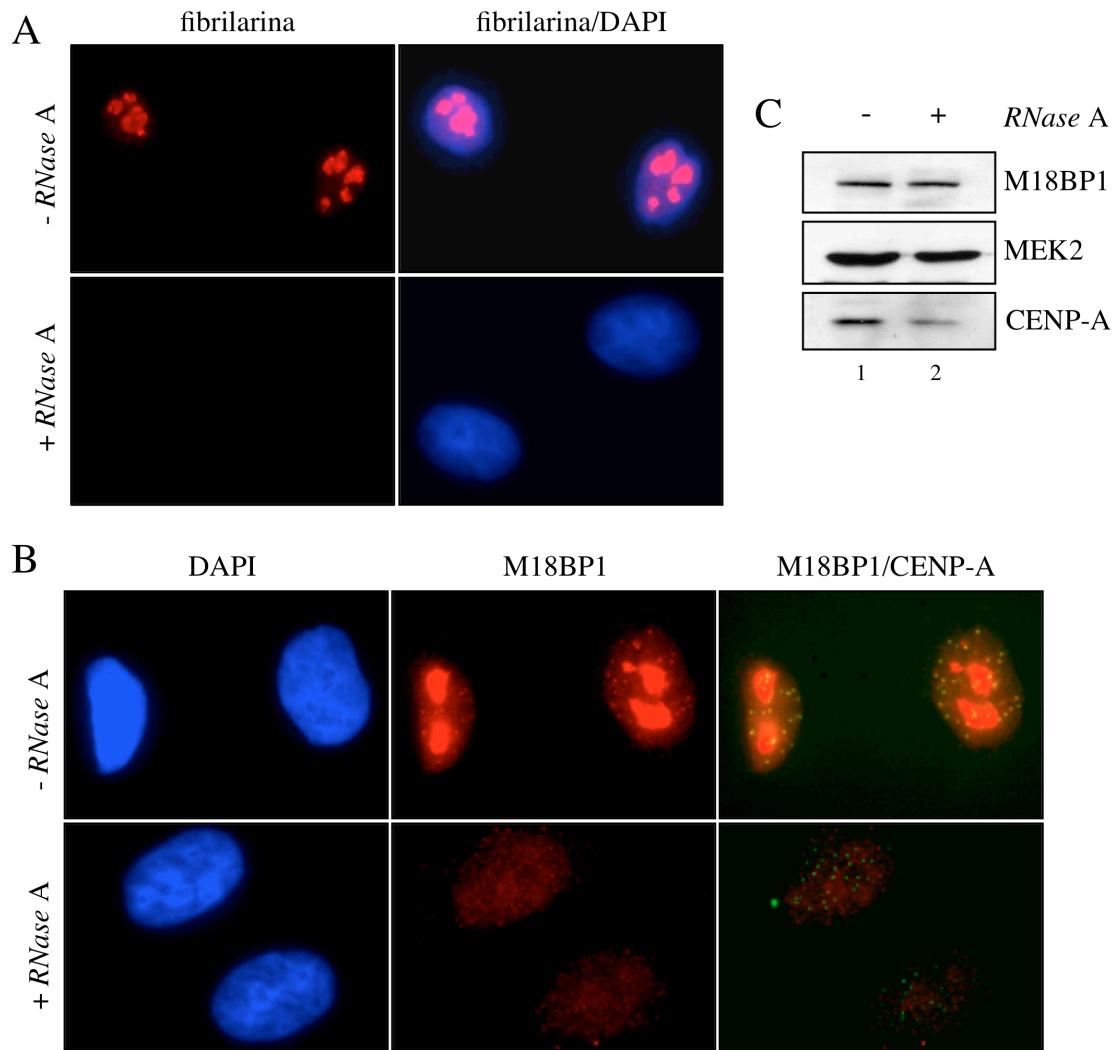
Se ha observado en células humanas que una fracción de CENP-C e INCENP (*Inner Centromere Protein*) se acumulan en los nucleolos en interfase hasta el momento de su localización en los centrómeros en mitosis. Se ha propuesto que ambas localizaciones, la nucleolar y la centromérica, dependen de la unión de estas proteínas a ARN centromérico (Wong et al., 2007). Puesto que M18BP1 también se detecta en el centrómero y en los nucleolos, decidimos comprobar si el complejo hMis18 también se une a ARN centromérico. Para ello analizamos mediante PCR reversa cuantitativa (qRT-PCR) el ARN presente en los inmunoprecipitados de cromatina (*RNA-ChIP*) obtenidos con anticuerpos que reconocen hMis18α y M18BP1 (Figura 37A). Para la amplificación por PCR se utilizaron *primers* contra las repeticiones de ADN satélite alfoide del cromosoma 21, que es transcripcionalmente activa

(Nakano et al., 2003). Efectivamente, detectamos ARN centromérico en los inmunoprecipitados de M18BP1, aunque no en los de hMis18 $\alpha$  (Figura 37B).



**Figura 37. M18BP1 interacciona con ARN centromérico.** (A) Esquema general del protocolo de *RNA-ChIP*. (B) Cuantificación del ARN centromérico detectado en los inmunoprecipitados de hMis18 $\alpha$ , M18BP1 o IgGs preinmune como control, con respecto al ARN centromérico total (*input*). Se emplean *primers* para amplificar la repetición de ADN satélite alfoide presente en la región centromérica del cromosoma 21.

A continuación, investigamos si la asociación de M18BP1 a ARN centromérico está relacionada con su unión al centrómero. Para ello, tratamos células HeLa durante 10 min con *RNase A*, que degrada específicamente ARN de una sola hebra, y a continuación fijamos y analizamos las células mediante inmunofluorescencia. Como control de la actividad *RNasa*, las células se tiñen con fibrilarina, una proteína del nucleolo sensible al tratamiento con este enzima (Figura 38A). En tanto que la localización de CENP-A no se ve afectada, la señal de M18BP1 desaparece de los centrómeros (Figura 38B). Además, tampoco se detecta M18BP1 en los nucleolos. Comprobamos por inmunoblot que los niveles de proteína M18BP1 no varían (Figura 38C). Este resultado sugiere que un ARN de hebra sencilla contribuye a mantener al complejo hMis18 en el centrómero, posiblemente a través de su interacción con M18BP1.

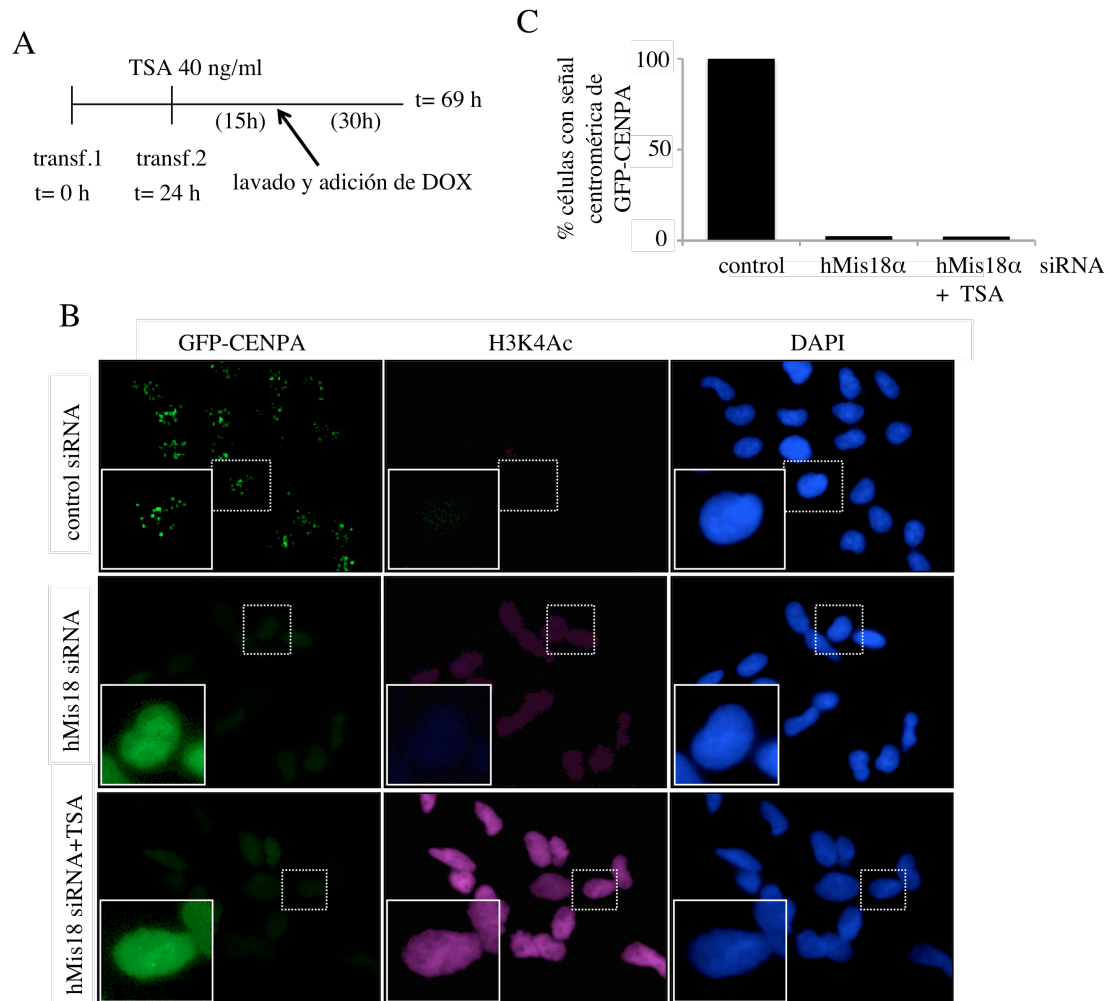


**Figura 38. Un componente de ARN estabiliza la asociación de M18BP1 al centrómero.** (A) Imágenes de inmunofluorescencia de células HeLa sin tratar o tratadas con *RNase A* durante 10 min (después de la preextracción de la fracción soluble de proteínas con detergente), fijadas y teñidas contra la proteína nucleolar fibrilarina (rojo) y DAPI (azul). (B) Las mismas se teñieron con anti-M18BP1 (rojo), anti-CENPA (verde) y DAPI (azul). (C) Análisis por inmunoblot de extractos totales de células sin tratar o tratadas con *RNase A*. Se muestran los niveles de MEK2 como control de carga.

### Mecanismo de acción de hMis18.

Cepas de levaduras mutantes para Mis18 y Mis16 presentan niveles elevados de histonas acetiladas en la región centromérica (Hayashi et al., 2004). Contrariamente, un estudio en células humanas muestra que la acción del TSA (*Trichostatin A*), un inhibidor de las deacetilasas de histonas de clase I y II, rescata parcialmente la falta de función de Mis18 (Fujita et al., 2007), sugiriendo que un aumento puntual de la acetilación en el centrómero permite la incorporación de CENP-A en ausencia de Mis18. En nuestras manos, sin embargo, el tratamiento con TSA de células con niveles reducidos de hMis18 durante 15h no aumenta el porcentaje de células que incorporan GFP-CENPA (Figura 39). Como control de que la droga

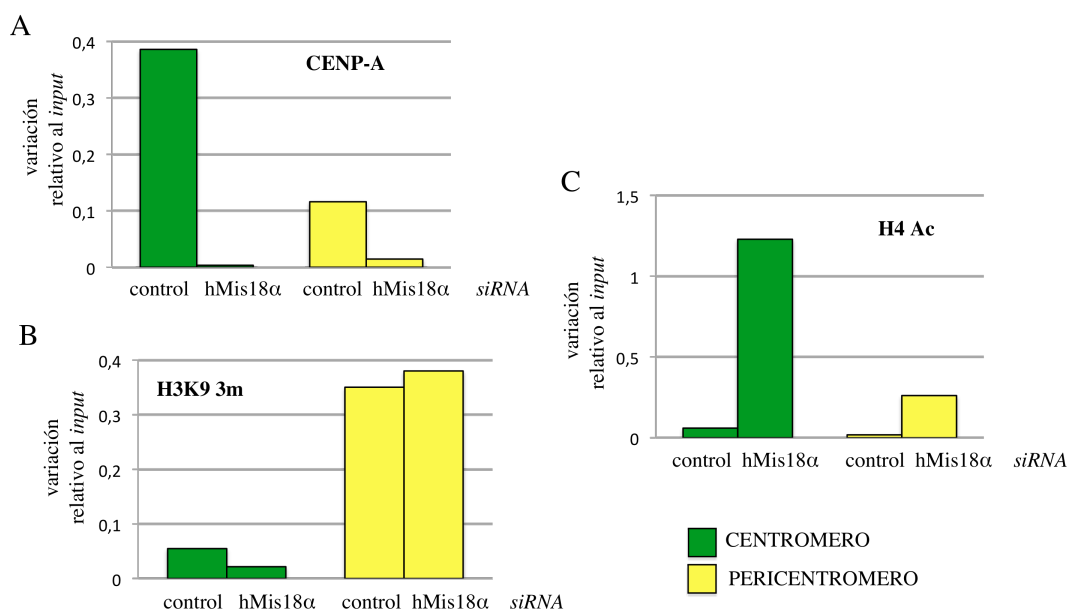
funciona correctamente, se observa un aumento considerable de la señal de la histona H3 acetilada en su lisina 4 (H3K4Ac) (Figura 39B).



**Figura 39. El aumento de la acetilación provocado por el tratamiento con TSA no reemplaza la función de hMis18.** (A) Esquema del procedimiento seguido para el silenciamiento de hMis18 y el tratamiento de las células con TSA. (B) Imágenes de inmunofluorescencia de células tratadas o no con TSA, e interferidas o no con *siRNAs* contra hMis18. La fluorescencia de GFP-CENPA se muestra en verde. El ADN se tiñen con DAPI (azul). La tinción de H3K4Ac se utiliza como control del efecto de la droga (morado). (C) Gráfico de barras que muestra el porcentaje de células con incorporación de GFP-CENPA en el centrómero en las condiciones indicadas (> 200 células por condición).

Para profundizar en el mecanismo molecular de hMis18, decidimos analizar de forma cuantitativa el efecto de la falta de este complejo en la acetilación de las histonas centroméricas. Para ello hicimos una inmunoprecipitación de cromatina (*ChIP*) con anticuerpos que reconocen la histona H4 acetilada (en K5, K8 y K12, K16), CENP-A y la histona H3 metilada en la lisina 9 (H3K9 3m), una marca característica de la heterocromatina pericentromérica, pero ausente de los centrómeros. La cromatina inmunoprecipitada se analizó mediante PCR cuantitativa (*qPCR*)

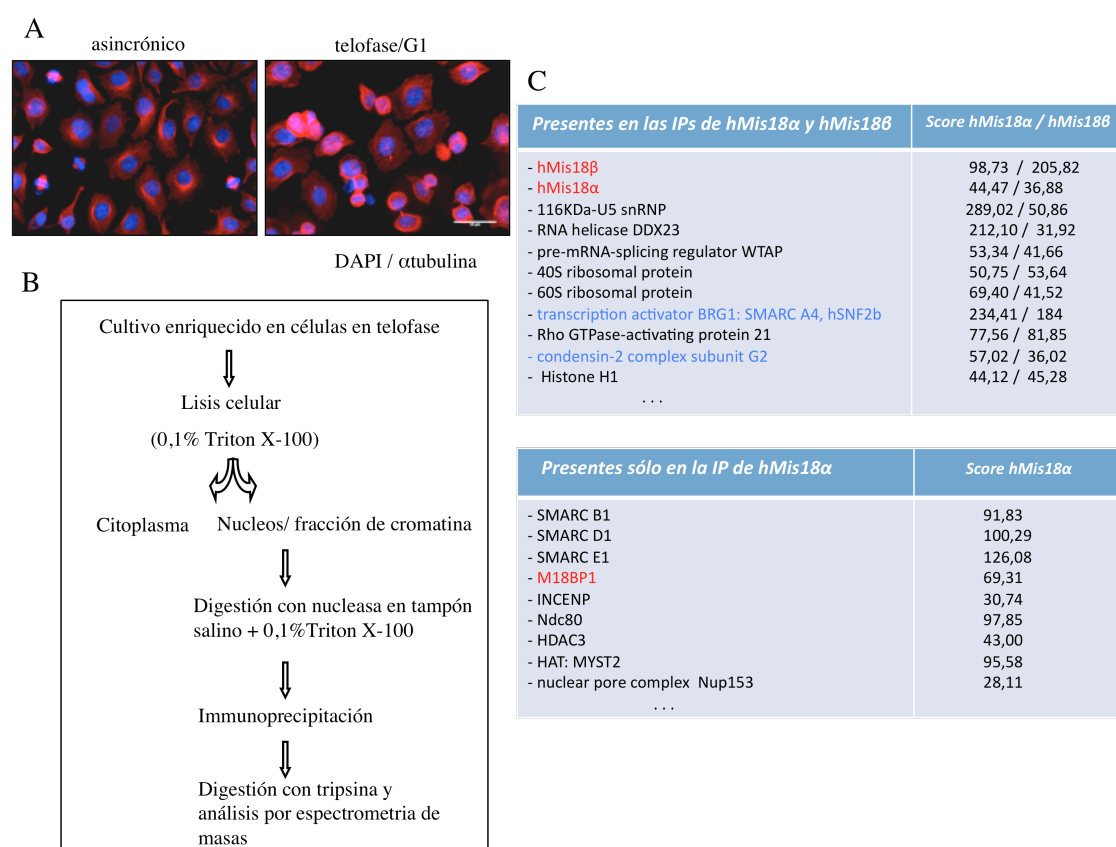
con oligonucleótidos iniciadores que amplifican bien una repetición del ADN satélite alfoide del centrómero del cromosoma 1, bien una región de la heterocromatina pericentromérica del mismo cromosoma. El enriquecimiento de CENP-A en la región centromérica y su clara disminución al reducirse los niveles de hMis18 $\alpha$  sirven como controles del experimento (Figura 40A). Se observa un aumento claro de H4Ac en el ADN satélite centromérico (Figura 40B). En cambio, la presencia de H3K9 3m en la heterocromatina pericentromérica y su ausencia del centrómero apenas se alteran al faltar hMis18 $\alpha$  (Figura 40C). Este resultado indica que Mis18 contribuye a mantener un nivel de baja acetilación en las histonas del centrómero en células humanas, de forma análoga a lo observado en levaduras (Hayashi 2004).



**Figura 40. La eliminación de hMis18 provoca un aumento de H4Ac en el centrómero.** Análisis de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de CENP-A (A) y las modificaciones de histonas H3K9 3m (B) y H4Ac (C), en células control y células con niveles reducidos de hMis18 $\alpha$ . Se utilizan *primers* para amplificar el ADN satélite alfoide de la región centromérica (en verde) y el ADN satélite 2 de la región pericentromérica (en amarillo), ambas del cromosoma 1. Los gráficos representan la cantidad de proteína inmunoprecipitada en cada condición con respecto a la cromatina total (*input*).

Se desconoce si el complejo hMis18 posee en sí mismo actividad deacetilasa o si se asocia a algún tipo de deacetilasa de histonas. Para identificar nuevos factores que interaccionan con hMis18 en el centrómero y que pueden ser importantes para su función, realizamos un análisis por espectrometría de masas de los inmunoprecipitados obtenidos con los anticuerpos que reconocen a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del complejo. Para aumentar el porcentaje de células en G1 temprana, en las que hMis18 está presente en el centrómero, se sincronizan las células en mitosis mediante cultivo en presencia de nocodazol y se recogen dos horas después de eliminar la droga del medio (Figura 41A). Se prepara entonces un extracto nuclear en el que las proteínas

de la cromatina se extraen mediante digestión con nucleasa micrococcal y se utiliza para la inmunoprecipitación (Figura 41B). El análisis de los precipitados identifica una larga lista de proteínas, de las cuales se muestran las presentes tanto en el inmunoprecipitado de  $\beta$  como en el de  $\alpha$ , pero no en el inmunoprecipitado control (Figura 41C, arriba). Además, algunas proteínas se detectan únicamente en el inmunoprecipitado de  $\alpha$  (Figura 41C, abajo). Entre las proteínas identificadas se encuentran los tres componentes del complejo hMis18, proteínas del centrómero/cinetocoro (Ndc80, INCENP), factores relacionados con el procesamiento y maduración del ARN (116-kDa-U5 snRNP, helicasa DDX23...) y enzimas que modifican las marcas de histonas como la deacetilasa HDAC3 y la acetiltransferasa MYST2.

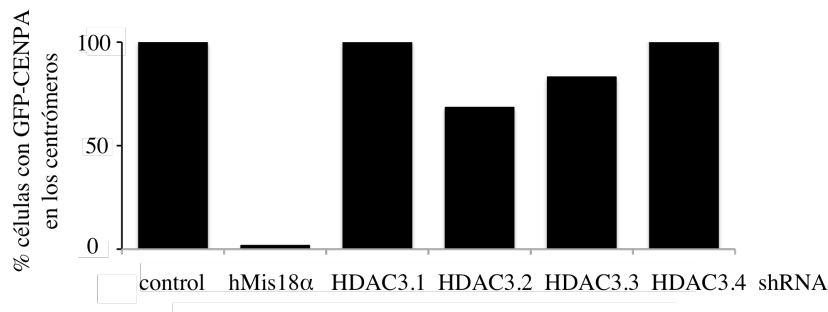


**Figura 41. Análisis mediante espectrometría de masas de inmunoprecipitados de hMis18.** (A) Imágenes de tinciones de inmunofluorescencia con  $\alpha$ -tubulina (rojo) y DAPI (azul) de un cultivo asincrónico de células HeLa (izquierda) y células recogidas 2 h después de eliminar del medio de cultivo el nocodazol, presente en las 16 h previas. (B) Esquema del protocolo seguido para la inmunoprecipitación del complejo hMis18. (C) Tabla que recoge las proteínas más relevantes identificadas en los inmunoprecipitados de hMis18 $\alpha$  y/o hMis18 $\beta$ . En rojo se muestran las proteínas del complejo hMis18 y en azul las proteínas que se validan por inmunoblot (ver figura 44).

Puesto que detectamos una deacetilasa de histonas en el precipitado de hMis18 $\alpha$ , HDAC3, enzima que además se sabe que tiene un papel específico en la región centromérica, analizamos su posible implicación en la incorporación de CENP-A. La cuantificación del

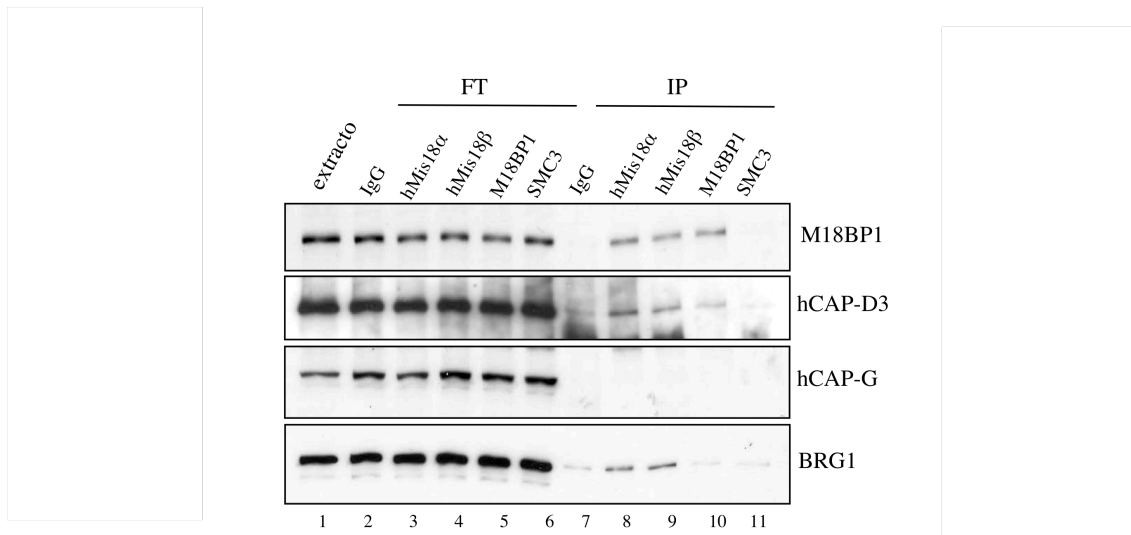


número de células que muestran GFP-CENPA en los centrómeros tras reducir los niveles de HDAC3 mediante *shRNAs* indica que, a diferencia hMis18 $\alpha$  (usado como control positivo) la función de HDAC3 no es esencial para la incorporación de los nucleosomas CENP-A (Figura 42).



**Figura 42. La eliminación de HDAC3 no afecta a la incorporación de CENP-A.** Gráfico de barras que muestra el porcentaje de células que presentan fluorescencia de GFP-CENP-A en los centrómeros tras el tratamiento con cuatro *shRNAs* frente a HDAC3 diferentes, un *shRNA* contra hMis18 $\alpha$  como control positivo y células sin interferir como control negativo.

Entre las proteínas que se asocian a hMis18 cabe destacar a la subunidad de condensina II hCAP-G2 así como la subunidad catalítica del la familia de remodeladores de cromatina SWI/SNF, BRG1/SMARCA4 y varias subunidades asociadas a ésta (BAF, *BRG1 Associated Factors*): BAF47/SMARCB1, BAF60/SMARCD1 y BAF57/SMARCE1 (Figura 41C). La interacción de hMis18 con estas proteínas se valida por inmunoblot a partir de reacciones de inmunoprecipitación con anticuerpos que reconocen hMis18 $\alpha$ , hMis18 $\beta$  y M18BP1. Así, en los tres inmunoprecipitados se detecta otra subunidad de condensina II, hCAP-D3, pero no la subunidad de condensina I hCAP-G, lo que corrobora una interacción específica con condensina II (Figura 43, carriles 8-10). Este resultado es muy interesante en vista del requerimiento de la función de condensina II para la incorporación de CENP-A que hemos descubierto en *Xenopus*. En el caso de BRG1, se asocia tanto a hMis18 $\alpha$  como a hMis18 $\beta$  (Figura 43, carriles 8 y 9). Es posible que BRG1 contribuya a la función de Mis18 modificando de algún modo la cromatina centromérica para permitir la incorporación de CENP-A.



**Figura 43. El complejo hMis18 interacciona con condensina II y con el remodelador de la cromatina, BRG1.** Reacciones de inmunoprecipitación a partir de extractos nucleares de células HeLa con anticuerpos que reconocen las distintas subunidades del complejo hMis18. Como control se usan IgGs preinmunes (carril 7) y un anticuerpo que reconoce la cohesina SMC3. Se analiza una alícuota de extracto (2% del total usado en cada reacción), la fracción de proteínas no unidas al anticuerpo (*flow through* (FT) y los inmunoprecipitados correspondientes mediante inmunoblot con los anticuerpos que se indican.

## DISCUSIÓN

## 6. DISCUSIÓN:

La correcta segregación del material genético durante la división celular depende en buena medida del centrómero. Qué determina la identidad centromérica y cómo se propaga dicha identidad son dos preguntas clave a cuya respuesta están encaminados numerosos estudios realizados en diversos organismos modelo a lo largo de la última década. El trabajo que se presenta en esta tesis es uno de ellos.

### 6.1 Desarrollo de dos ensayos para medir la incorporación de CENP-A:

El primer objetivo de esta tesis fue el desarrollo de dos ensayos que permitieran cuantificar la incorporación de CENP-A a la cromatina centromérica, uno empleando como sistema experimental extractos de huevos de *Xenopus laevis* y otro, células humanas en cultivo. Numerosos estudios centrados en el proceso de ensamblaje de cromatina o en la función de las variantes de la histona H3, H3.1 y H3.3, (Quivy et al., 2001, Ray-Gallet et al., 2002) han empleado extractos de huevos de *Xenopus* como sistema modelo. En nuestro caso es especialmente apropiado porque permite analizar el efecto de la eliminación de un factor en una sola ronda de incorporación de CENP-A, sin acumulación de errores procedentes de rondas anteriores o alteración de la progresión del ciclo celular. Esto es importante puesto que la carga de CENP-A está limitada a un momento muy concreto del ciclo celular y la eliminación de algún factor que afecte a la progresión del ciclo celular puede afectar también, de forma indirecta, a la incorporación de CENP-A.

En una primera aproximación, intentamos cuantificar mediante inmunofluorescencia la señal de la proteína exógena myc-CENPA añadida al extracto utilizando un anticuerpo anti-myc y así, visualizar exclusivamente la CENP-A de nueva incorporación. Desafortunadamente, la eficiencia de carga de myc-CENPA es muy baja, lo que dificulta enormemente el análisis. El motivo por el que la carga de esta proteína es ineficiente, a pesar de ser funcional, es que compite mal con la CENP-A endógena por la unión a XHJURP (Figura 21C). Por ello, decidimos medir la variación en la intensidad de la señal de CENP-A endógena obtenida con un anticuerpo específico contra esta proteína. Como se presenta en la primera parte de los resultados, la incorporación de CENP-A que recapitulamos en el tubo de ensayo en cromosomas obtenidos en extractos de *Xenopus* presenta los mismos requerimientos observados en células humanas. Por tanto, nuestro ensayo permite evaluar a nivel molecular la implicación directa de posibles factores en la incorporación de los nucleosomas CENP-A al centrómero.

En paralelo, para estudiar el mismo proceso en el contexto de una célula somática, generamos una línea celular estable que expresa una versión de CENP-A marcada con GFP bajo el control del promotor de la tetraciclina. De esta forma, analizamos mediante la fluorescencia

de la proteína GFP la dinámica de asociación y disociación de la nueva CENP-A. El empleo de esta línea celular nos permite evaluar el efecto de mecanismos no muy bien caracterizados en el sistema embrionario de *Xenopus* tales como la transcripción o la modificación postraduccional de histonas, en el proceso de incorporación de CENP-A.

## **6.2 Mecanismos que contribuyen a la restricción temporal de la incorporación de CENP-A:**

Para perpetuar la identidad centromérica es necesario que se ensamblen nuevos nucleosomas CENP-A en cada ciclo celular. El momento de dicha incorporación varía entre los diferentes organismos (Figura 4A). Nuestros resultados muestran que en extractos de *Xenopus*, al igual que en células humanas, la carga de nueva CENP-A tiene lugar a la salida de mitosis y es independiente de la replicación de la región centromérica (Figuras 12, 13 y 29) (Shelby et al., 2000, Jansen et al., 2008). Existen diferentes mecanismos que contribuyen a la presencia exclusiva de CENP-A en la cromatina del centrómero y entre ellos, los que afectan a la transcripción y estabilidad de CENP-A no parecen operar en los extractos embrionarios. Durante los primeros ciclos embrionarios apenas hay transcripción, y los niveles tanto de la CENP-A soluble almacenada en el citoplasma de los oocitos como de la CENP-A exógena (myc-CENPA) añadida al extracto no varían durante una reacción de ensamblaje (Figura 19B).

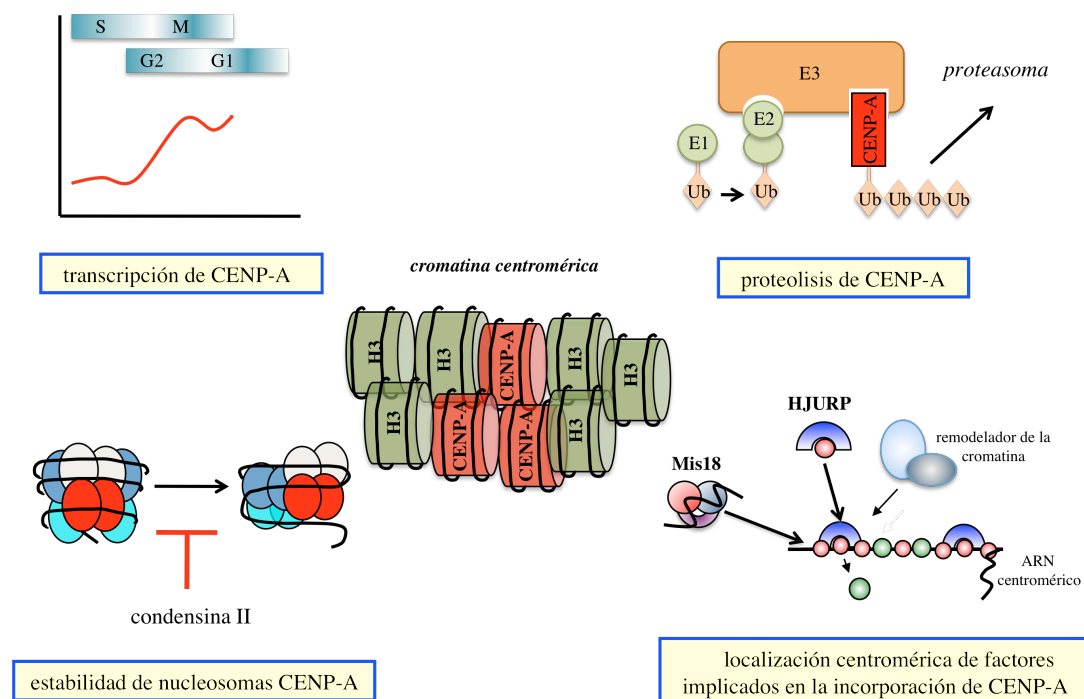
En células humanas, sin embargo, los niveles de CENP-A soluble parecen estar regulados tanto a nivel transcripcional como por proteólisis. La expresión de CENP-A es muy reducida durante las fases G1 y S y se activa a partir de G2 (Shelby et al., 2000). Cuando se induce la expresión de proteína exógena GFP-CENPA en un momento del ciclo celular en el que los niveles de CENP-A endógena son bajos (durante G1-S), ésta se incorpora en regiones de cromatina no centromérica (Figura 29). Dicha incorporación es independiente de los mecanismos que dirigen la asociación de CENP-A a los centrómeros, mediados por Mis18 y HJURP (Figura 31). Estos resultados sugieren que la regulación transcripcional de CENP-A contribuye a la especificidad temporal y espacial de su incorporación. De hecho, se han encontrado niveles elevados de ARN mensajero de CENP-A en tumores colorrectales primarios en los que CENP-A se acumula en regiones de cromatina no centromérica (Tomonaga et al., 2003). Esto parece relacionar la sobreexpresión de CENP-A con la inestabilidad genómica y como consecuencia, el desarrollo del cáncer. El origen de esta inestabilidad es incierto puesto que, a diferencia de lo que ocurre en células de *Drosophila* (Heun et al., 2006, Olszak et al., 2011), en células humanas la presencia de CENP-A en lugares ectópicos no da lugar a la formación de cinetocoros funcionales (Van Hooser et al., 2001, Gascoigne et al., 2011).

Por otro lado, cuando se bloquea la progresión del ciclo celular en la transición G1/S al tiempo que se induce la expresión de GFP-CENPA, los niveles de esta proteína aparecen

prácticamente indetectables. Sin embargo, el tratamiento con el inhibidor MG132 permite dicha detección (Figura 32). Parece pues que GFP-CENP-A es degradada por el proteasoma. El análisis de las fracciones soluble y unida a cromatina a lo largo del ciclo celular sugiere que GFP-CENPA soluble es inestable en todo momento, pues sólo detectamos proteína en la cromatina. En general, el exceso de histonas tiene consecuencias deletéreas para la célula que incluyen pérdida de cromosomas (Meeks-Wagner et al., 1986), aumento de sensibilidad a agentes que dañan el ADN y citotoxicidad (Gunjan et al., 2003, Singh et al., 2009). En concreto, como ya hemos mencionado, el exceso de CENP-A provoca su acumulación en regiones de eucromatina (Shelby et al., 1997, Collins et al., 2007, Moreno-Moreno et al., 2006) y esto puede romper el balance entre las histonas H3 y CENP-A. En levaduras se ha mostrado que un exceso de H3 puede provocar la incorporación de ésta en lugar de CENP-A en la cromatina del centrómero provocando defectos de segregación (Castillo et al., 2007). Cabe suponer que la célula posee mecanismos que controlan los niveles de proteína de las histonas, y en particular de CENP-A, a lo largo del ciclo celular. En *S. cerevisiae* una E3-ligasa de ubiquitina, Psh1, dirige la proteólisis de CENP-A en condiciones de sobreexpresión a través de su unión al dominio CATD (Ranjitkar et al., 2010, Hewawasam et al., 2010). De esta forma, la interacción de HJURP/Scm3 a CENP-A a través de este mismo dominio impediría la acción de Psh1. Psh1 no está conservada en humanos. Sin embargo, recientemente se ha identificado en *Drosophila* una proteína de la familia “F-box” denominada Ppa, que forma parte de la E3-ubiquitín ligasa SCF, como mediadora de la degradación de CENP-A en interfase (Moreno-Moreno et al., 2011). Al igual que Psh1, Ppa interacciona con CENP-A a través del CATD. Mecanismos similares podrían existir en células humanas. Se ha propuesto que una de las funciones de HJURP sería la de proteger a la CENP-A soluble, ya que en su ausencia los niveles totales de CENP-A se reducen (Dunleavy et al., 2009). La expresión de HJURP es también baja durante G1 (Foltz et al., 2009), por lo que puede que durante esta fase quede GFP-CENPA libre, no asociada a HJURP, expuesta a los posibles mecanismos de degradación.

En resumen, la célula asegura la correcta incorporación de CENP-A a través de múltiples mecanismos que incluyen la regulación de la expresión y la estabilidad de CENP-A (Figura 44). Durante G1, la CENP-A soluble estaría en su mayor parte asociada a HJURP (ambos sintetizados en G2 del ciclo anterior) y de este modo protegida de los posibles mecanismos de proteólisis. Esta fracción de CENP-A asociada a HJURP sería la que se incorporaría a cromatina. La GFP-CENPA soluble sintetizada en células paradas en G1/S, que posiblemente no encuentra HJURP endógeno “libre” con el que interaccionar, es degradada. Durante la fase S, una fracción de GFP-CENPA se incorpora a la cromatina, posiblemente mediante la acción de otras chaperonas distintas de HJURP, como CAF1 o HIRA. En G2 se sintetizan nuevas moléculas de HJURP (y CENP-A) y una parte de GFP-CENPA competiría con la CENP-A endógena de nueva síntesis por unirse a ellas, de modo que en la siguiente G1,

HJURP incorporaría tanto una como otra en los centrómeros. Por supuesto, a estos mecanismos de control hay que sumar la localización específica, en el tiempo y en el espacio, de factores necesarios para la incorporación de CENP-A, como HJURP y Mis18, así como la estabilización de nucleosomas CENP-A, específicamente en la región centromérica. Todos ellos se discuten a continuación.



**Figura 44. Esquema de los mecanismos que contribuyen a la presencia exclusiva de CENP-A en los centrómeros.** En células humanas, la expresión de CENP-A está regulada durante el ciclo celular de forma que durante G2/M, antes de su incorporación en los centrómeros en G1, aumenta su transcripción. Además, en levaduras, *Drosophila* y, probablemente, células humanas los niveles de CENP-A están regulados por proteólisis, mecanismo que previene su incorporación en regiones de eucromatina. Por otro lado, los nucleosomas CENP-A permanecen estables en la cromatina del centrómero, este trabajo muestra que condensina II tiene un papel en esta estabilización evitando su desensamblaje de la cromatina (se discute en 6.3). Finalmente, la localización centrómerica de factores esenciales para la carga de CENP-A facilita su acumulación exclusiva en la cromatina del centrómero.

### 6.3 Condensina II: doble función en la cromatina del centrómero:

La incorporación de CENP-A al comienzo de G1 requiere un paso previo por mitosis en células humanas (Jansen et al., 2008) y también en *Xenopus* (Figura 14). Una posible explicación para este requerimiento es que algún factor esencial para la carga de CENP-A esté activo sólo en la transición entre mitosis y G1. Por ejemplo, HJURP/CENP-A o Mis18 podrían ser objeto de modificaciones postraduccionales necesarias para llevar a cabo la carga de CENP-A. Para investigar esta hipótesis, sería interesante comprobar si existen tales modificaciones e identificar los factores que las producen. La salida de mitosis es el único momento en el cual la célula tiene muy baja actividad CDK (*cyclin-dependent kinase*), por lo que cabría imaginar que la

fosforilación de los factores anteriormente mencionados por CDKs impediría su localización centromérica.

Alternativamente, es posible que durante mitosis la cromatina centromérica adopte una estructura tridimensional que permita la posterior carga de CENP-A. Las condensinas, complejos multiproteicos con actividad ATPasa, promueven la condensación de los cromosomas durante mitosis (Hudson et al., 2009). En la mayoría de los organismos existen dos complejos condensina, condensina I y condensina II, y su abundancia relativa determina la longitud y grosor del cromosoma metafásico (Shintomi et al., 2011). La condensina II, cinco veces menos abundante que la condensina I en extractos de *Xenopus*, se acumula preferentemente en la región centromérica (Figura 15B). Nuestros resultados demuestran que su presencia en dicha región es necesaria para retener a los nucleosomas CENP-A existentes y para facilitar la incorporación de nuevos nucleosomas CENP-A. En cuanto a la primera función, hemos observado que en ausencia de condensina II, una fracción de nucleosomas CENP-A se pierde de la cromatina del centrómero (Figura 16). Se ha propuesto que una mayor inestabilidad de los nucleosomas CENP-A con respecto a los nucleosomas H3 podría facilitar su eliminación de regiones de eucromatina a las que se incorporaría por ejemplo, en condiciones de sobreexpresión en fase S (Moreno-Moreno et al., 2006, Conde e Silva et al., 2007) o en sitios de rotura de doble hebra del ADN (Zeitlin et al., 2009). Por otro lado, esta inestabilidad debería ser contrarrestada por alguna característica de la cromatina centromérica para así mantener la proporción correcta entre nucleosomas que contienen CENP-A y los que contienen H3. Nosotros proponemos que la estructura de la cromatina centromérica mediada por condensina II estabiliza a los nucleosomas CENP-A. Como se muestra en la Figura 17, esta función es esencial no sólo en mitosis sino también en interfase, por lo que condensina II también estabilizaría los nucleosomas de reciente incorporación. Si bien las condensinas se asocian a cromatina preferentemente en mitosis (Losada et al., 1998; Ono et al., 2004), es posible que una fracción, difícil de detectar, permanezca en la cromatina centromérica durante interfase. Por otro lado, sería de gran interés investigar si algunos de los factores que han sido relacionados con la carga de CENP-A tienen en realidad un papel en su retención en el centrómero. Asimismo, cabe preguntarse cómo afectaría la falta de condensina II a la presencia de otros componentes de la cromatina centromérica como, por ejemplo, las proteínas del CCAN (*constitutive centromeric associated network*).

En cuanto a la segunda función, hemos demostrado que la eliminación específica de condensina II impide la carga de nueva CENP-A (Figura 18). La reducción en la intensidad de CENP-A no se puede explicar únicamente por la pérdida de nucleosomas CENP-A ya depositados puesto que el defecto de carga es mucho mayor y alcanza incluso valores negativos en nuestro ensayo. Puede que la estructura de la cromatina impuesta por condensina II durante



mitosis dicte el reconocimiento de la región centromérica por parte de factores esenciales en la carga de CENP-A en interfase. En la Figura 25 se muestra que la eliminación de condensina II no afecta a la localización centromérica de HJURP, el principal factor de carga de CENP-A. Queda por comprobar si condensina II regula la localización o función de alguna otra proteína que actúa en el proceso de ensamblaje de CENP-A después de la unión de HJURP a los centrómeros. Entre estas proteínas podrían estar remodeladores de la cromatina como FACT, RSF o CHD1, ya implicados en el proceso de incorporación o mantenimiento de nucleosomas CENP-A (Prasad et al., 2011). Otra posibilidad es que la localización de XHJURP que detectamos en cromosomas ensamblados en extractos de *Xenopus* no refleje el momento en el que lleva a cabo su función como factor de carga de CENP-A, como se discute más adelante (apartado 6.4).

Como se muestra en las Figuras 41 y 43 hemos detectado una interacción entre hMis18 y condensina II en extractos de cromatina obtenidos de células humanas en fase G1 temprana. Aún no conocemos el significado biológico de esta asociación pero pensamos que puede ser importante para la función de ambas en la incorporación de CENP-A. El complejo hMis18 aparece en los centrómeros al final de mitosis e inicio de G1 (Fujita et al., 2007 y Figura 35). No se conoce cómo se regula esta asociación ni cuál es la estructura presente en la cromatina del centrómero que reconoce hMis18. Una posibilidad que sería interesante investigar es si la ausencia de condensina II afecta a la localización del complejo hMis18 o si este complejo contribuye a retener una fracción de condensina II en el centrómero al final de mitosis que a su vez facilita la carga de nueva CENP-A.

La importancia de la condensina en la dinámica de ensamblaje de los nucleosomas CENP-A no es una característica exclusiva de los extractos de *Xenopus*. En levaduras, mutantes en los componentes del complejo condensina presentan niveles reducidos de CENP-A en el centrómero (Yong-Gonzalez et al., 2007). Un estudio en células humanas muestra igualmente que la incorporación de nueva CENP-A disminuye a la mitad al reducirse los niveles de SMC2 – componente común a ambas condensinas- mediante ARNi (Samoshkin et al., 2009). La ausencia de condensina altera la estructura de los cromosomas mitóticos y en particular la región centromérica que, sometida a las fuerzas de los microtúbulos, no es suficientemente elástica y se distorsiona (Oliveira et al., 2005). Esto provoca a su vez defectos en la localización de Aurora B, una quinasa mitótica esencial en múltiples aspectos de mitosis, y que fosforila a CENP-A (Zeitlin et al., 2007). Sería posible que el defecto observado en la carga de CENP-A al reducir los niveles de condensina fuera una consecuencia indirecta de esta deslocalización de Aurora B (Samoshkin et al., 2009). Sin embargo, la eliminación de condensina II no provoca la deslocalización de Aurora B en los cromosomas ensamblados en extractos de *Xenopus* (datos no mostrados). De todas formas, dada la importancia de Aurora B en el ensamblaje del cinetocoro

(Vigneron et al., 2004) en el futuro queremos llevar a cabo un ensayo de carga de CENP-A en extractos sin Aurora B.

#### **6.4 Incorporación de CENP-A mediada por HJURP:**

Una cuestión fundamental es cómo se ensamblan los nucleosomas CENP-A en la cromatina centromérica a nivel molecular. Una de las primeras chaperonas implicadas en el mecanismo de incorporación de CENP-A fue RbAp48. Este factor inmunoprecipita con H4 y CENP-A en células de *Drosophila* y su presencia facilita el ensamblaje de nucleosomas CENP-A en ADN de plásmido en ensayos *in vitro* (Furuyama et al., 2006). A partir de este resultado se propuso un modelo “de exclusión” según el cual CENP-A se asocia preferentemente a esta chaperona en vez de a CAF-1 o HIRA, complejos de ensamblaje de las histonas H3.1 y H3.3, respectivamente, y se deposita de forma pasiva en los centrómeros. Este modelo no explica por qué la incorporación de CENP-A está restringida a un momento concreto del ciclo celular y tiene lugar exclusivamente en los centrómeros. Al menos en *Xenopus*, la carga de CENP-A no se ve afectada por la eliminación de RbAp48 del extracto (datos no mostrados). Parece más probable que exista un mecanismo de ensamblaje que regule tanto el momento como el lugar de incorporación de CENP-A. Los resultados presentados en esta tesis confirman esta hipótesis. Observamos que la proteína exógena myc-CENPA añadida a un extracto sin CENP-A no se incorpora en los centrómeros (Figura 19A) y no rescata el defecto de carga de extractos sin CENP-A (Figura 20B), a pesar de ser funcional y permanecer estable durante todo el tiempo que dura la reacción de ensamblaje. Esto indica que CENP-A no es capaz de unirse por sí sola a la región centromérica. Efectivamente, mostramos que CENP-A se almacena en el extracto soluble asociada a un factor necesario para su carga, la proteína HJURP (Figura 21). Al eliminar XHJURP del extracto empleando un anticuerpo específico, los niveles de CENP-A soluble se reducen aproximadamente un 50% (Figura 22), confirmando la asociación entre ambos factores. En estas circunstancias, no hay carga de CENP-A (Figura 22). A pesar de la escasa homología de secuencia entre la proteína HJURP de humanos y *Xenopus*, encontramos que hHJURP es capaz de interaccionar con CENP-A y depositarla en cromatina en un extracto sin XHJURP endógeno (Figuras 20 y 22). Estos datos muestran que la función de HJURP como factor de carga específico de CENP-A (Foltz et al., 2009, Dunleavy et al., 2009, Sánchez-Pulido et al., 2009) está conservada en *Xenopus*.

Diversos estudios indican que HJURP reconoce el dominio CATD de CENP-A (Dunleavy et al., 2009, Foltz et al., 2009, Zhou et al., 2011, Hu et al., 2011). Por otro lado, HJURP interacciona con CENP-A a través de un dominio N-terminal denominado *CENP-A binding domain* (CBD) (Schuaib et al., 2010). Scm3, el homólogo de HJURP en levaduras, permanece asociado a la cromatina del centrómero durante todo el ciclo celular a través de su unión a la proteína centromérica Ndc10 (Cho et al., 2011, Xiao et al., 2011), e incluso podría ser

un componente estructural del nucleosoma centromérico. En cambio, nuestros datos muestran que XHJURP no es parte constitutiva del centrómero, ya que se asocia y disocia de la cromatina dependiendo del momento del ciclo (Figura 23). Apoyando este resultado, se ha propuesto que la unión de la proteína humana HJURP a CENP-A ocluye el sitio de interacción con el ADN por lo que HJURP no podría estar presente en el nucleosoma final (Zhou et al., 2011, Hu et al., 2011). Se ha sugerido que dos moléculas de HJURP, cada una de las cuales se uniría a un dímero de CENP-A/H4, interaccionan para depositar un tetrámero de CENP-A/H4 en los centrómeros (Schuaib et al., 2010). Puesto que nosotros no hemos detectado co-inmunoprecipitación entre la CENP-A endógena y las versiones marcadas de CENP-A añadidas de forma exógena al extracto (Figura 21C), creemos que, al menos en su forma soluble, un dímero de CENP-A/H4 se une a una molécula de XHJURP. Es posible que la interacción entre dos de estas “unidades” tenga lugar en cromatina.

Curiosamente, la localización de XHJURP no refleja claramente su función. A pesar de que nuestros resultados indican de forma clara y reproducible que la incorporación de CENP-A tiene lugar al inicio de interfase (durante los primeros 55 min que siguen a la adición de calcio a un extracto CSF) (Figura 12), en este período no somos capaces de detectar XHJURP en los centrómeros. Puede que en esta fase su asociación a la región centromérica sea lábil o extremadamente dinámica y por este motivo sea difícil detectarla. En cambio, sí observamos una señal de XHJURP específica, aunque débil, en algunos de los centrómeros de cromosomas mitóticos ensamblados en extracto CSF (Figura 23B). Cabe señalar que en los cromosomas CSF de *Xenopus* la estructura del cinetocoro no está totalmente formada ya que muchos de sus componentes no están aún ensamblados y esto hace que en general, las señales observadas sean débiles. XHJURP se acumula claramente en los centrómeros al final de interfase, permanece en la siguiente mitosis y desaparece al inducir la entrada en una segunda interfase. Como ya hemos mencionado, a partir de esta localización concluimos que XHJURP no forma parte del nucleosoma centromérico final pero no podemos explicar por qué se acumula en los centrómeros al final de interfase y en mitosis, momentos en los que no se detecta carga de nueva CENP-A.

En células humanas, HJURP aparece en el centrómero sólo en el momento en que ocurre la carga de CENP-A (Dunleavy 2009, Foltz 2009) y luego se disocia de la cromatina. Mis18 aparece en los centrómeros desde final de anafase hasta el inicio de G1, antes de la llegada de HJURP y de que se produzca la carga de CENP-A (Figura 35, Fujita et al., 2007, Foltz 2009). La eliminación de Mis18 en extractos de *Xenopus* no afecta a los niveles solubles de XHJURP y las dos proteínas no co-inmunoprecipitan (Figura 27). Tampoco detectamos co-inmunoprecipitación de estos factores en extractos de células humanas (datos no mostrados), por lo no parece existir una interacción física entre ambas. La eliminación de

HJURP mediante ARNi en células humanas no afecta a la presencia de hMis18 en el centrómero (Figura 36), lo cual confirma que hMis18 actúa antes que HJURP en el proceso de ensamblaje de CENP-A. Además, este resultado sugiere que hMis18 no reconoce CENP-A en el centrómero, ya que la eliminación de HJURP provoca que los niveles de esta proteína en cromatina sean prácticamente indetectables (Figura 31) y aún así hMis18 está presente en la cromatina del centrómero. A continuación nos preguntamos si Mis18 dirige a HJURP a esta región. Desafortunadamente, el único anticuerpo comercial anti-HJURP disponible no funciona para inmunofluorescencia y una versión de HJURP marcada con RFP expresada en células humanas mediante transfección no muestra localización centromérica en ninguna fase del ciclo celular. Sin embargo, se acaba de publicar un estudio que afirma que, efectivamente, hMis18 es necesaria para que HJURP se localice en la región centromérica en G1 (Barnhart et al., 2011).

Cuando se fuerza la unión de HJURP a un *locus* no centromérico mediante un sistema LacO/LacI, se observa incorporación de nucleosomas CENP-A en cromatina *in vivo*, independientemente de la acción de Mis18 (Barnhart et al., 2011). Estos resultados sugieren que la función de Mis18 es fundamental para acumular al complejo HJURP/CENPA específicamente en la región centromérica, pero no se requiere para el proceso de carga de CENP-A en sí. HJURP es capaz por sí sólo de ensamblar nucleosomas CENP-A *in vitro* (Shuaib et al., 2009, Shivaraju et al., 2011) pero es posible que la incorporación eficiente y estable de nucleosomas CENP-A *in vivo* necesite la acción de factores adicionales como FACT, CHD1 y RSF.

### **6.5 Papel de la transcripción en la incorporación de CENP-A:**

Como ya hemos mencionado, en células humanas Mis18 forma un complejo compuesto por hMis18 $\alpha$ , hMis18 $\beta$  y M18BP1 que localiza en los centrómeros durante un período muy breve del ciclo celular entre final de mitosis y G1 temprana (Figuras 33 y 35). Al reducir los niveles de hMis18 $\alpha$  mediante ARNi se reducen drásticamente los de hMis18 $\beta$ , y en menor medida los de M18BP1, pero en cualquier caso M18BP1 no es capaz de unirse a los centrómeros (Figura 36), lo que sugiere que las tres subunidades son necesarias para la formación de un complejo funcional. La subunidad M18BP1 se asocia a ARN centromérico (Figura 37). La técnica de inmunoprecipitación empleada (*RNA-ChIP*) no permite determinar si esta interacción ocurre de forma soluble o depende de cromatina. Una posibilidad es que el ARN centromérico sirva de elemento estructural sobre el cual se ensambla el complejo Mis18 y los factores asociados a él y/o que dirija su asociación a los centrómeros. Un tratamiento breve de células permeabilizadas con *RNase A*, específica de ARN de cadena sencilla, provoca la disociación de M18BP1 del centrómero (Figura 38). Este resultado sugiere que el complejo Mis18 se asocia a un ARN de hebra sencilla, que estabiliza su unión a la cromatina del centrómero. CENP-C, otra proteína

constitutiva del centrómero que interacciona con nucleosomas CENP-A, al menos *in vitro*, también se une a ARN centromérico (Wong et al., 2007). Una fracción de CENP-C aparece en los nucleolos durante interfase y se ha sugerido que estos orgánulos facilitan el ensamblaje de ribonucleoproteínas que luego se dirigen al centrómero. Curiosamente, M18BP1 también se acumula en los nucleolos en interfase (Figura 35). Es posible por tanto que una de las funciones de la transcripción del ADN satélite centromérico sea facilitar el ensamblaje del complejo Mis18 y/o CENP-C, y promover su asociación a la cromatina centromérica. Esto podría explicar el requerimiento de nucleosomas H3 dimetilados en lisina 4 (H3K4me2) en el centrómero para la localización centromérica de HJURP y la consiguiente incorporación de CENP-A en un cromosoma artificial humano (HAC) (Bergmann et al., 2010). Esta modificación es típica de regiones de eucromatina y se ha identificado asociada a factores de elongación de la transcripción (Sims et al., 2005, Kim et al., 2009). De hecho, la eliminación de H3K4me2 reduce la transcripción del ADN satélite presente en el centrómero del HAC. En embriones tempranos de *Drosophila* mutantes para el factor Hth también se observa una clara disminución de CENP-A en los centrómeros y defectos de segregación cromosómica, al tiempo que se detecta una reducción de la transcripción del satélite centromérico 359 por la ARN polimerasa II (Salvany et al., 2009). Si bien Mis18 no está presente en *Drosophila*, la función y localización de CENP-C podrían depender de la transcripción centromérica.

Por otro lado, se ha visto que la histona H3.3, asociada normalmente a actividad transcripcional, aparece en la región centromérica tras la fase S, momento en que los nucleosomas CENP-A parentales se reparten entre las dos moléculas hijas de ADN (Dunleavy 2011). Es posible que durante la replicación, CAF1 incorpore nucleosomas H3.1 en lugar de CENP-A en la cromatina centromérica y que al menos una parte de estos sean reemplazados por nucleosomas H3.3 en un proceso acoplado a la transcripción de los satélites centroméricos. Los nucleosomas que contienen H3.3 son más fáciles de desensamblar (Jin & Felsenfeld 2007) y podrían por tanto facilitar su intercambio por nucleosomas CENP-A en G1. En este escenario, la transcripción de la cromatina centromérica podría ser fundamental para permitir la carga de CENP-A por HJURP.

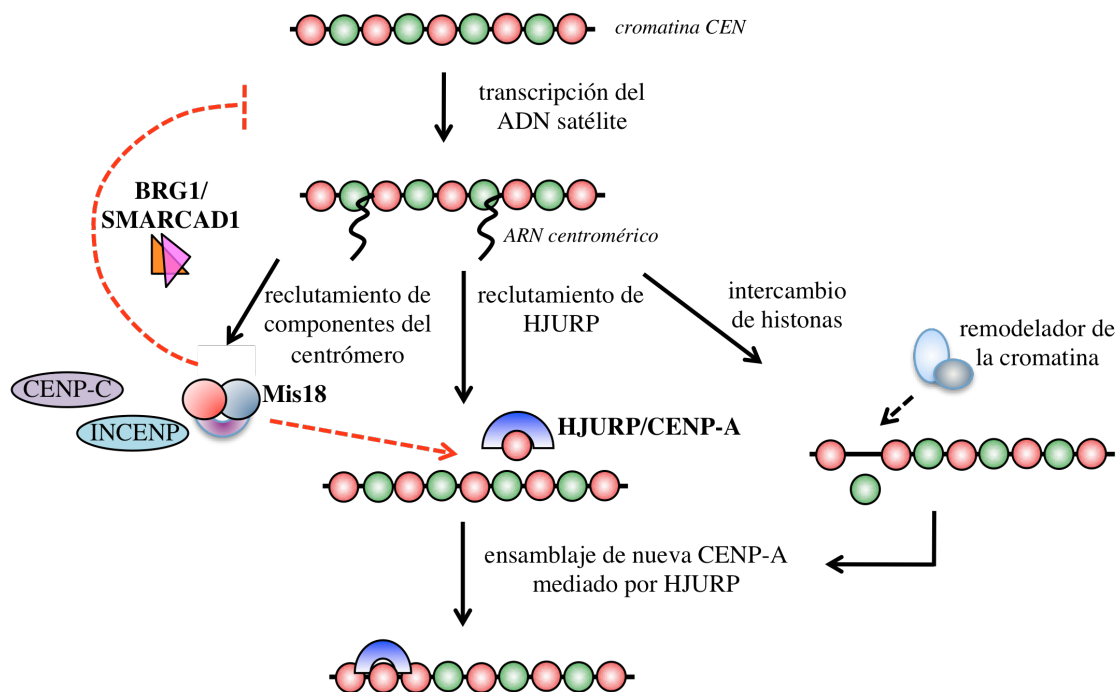
Ciertas evidencias sugieren que Mis18 podría controlar el nivel de acetilación en la cromatina centromérica pero el sentido de esta regulación no está definido claramente. Así, en mutantes *mis18* en levadura se observa un incremento de histonas acetiladas en el centrómero (Hayashi et al., 2004), lo que sugiere que Mis18 promueve deacetilación. Sin embargo, en células humanas Mis18 parece promover la acetilación, pues su función puede ser reemplazada parcialmente por el tratamiento de las células con TSA, un inhibidor de las histonas deacetilasas (Fujita et al., 2007). En nuestras manos, el tratamiento de las células carentes de Mis18 con TSA no rescata el defecto de carga de CENP-A (Figura 39). Además, observamos que en

ausencia de Mis18 se produce un aumento de la histona H4 acetilada en la región centromérica (Figura 40), de forma similar a lo descrito en levaduras. No sabemos si el efecto es específico de la histona H4 o la acetilación de otras histonas se ve también afectada, y en qué residuos. Esto nos puede dar una idea del enzima que lleva a cabo la deacetilación de las histonas del centrómero.

Nuestros resultados muestran que Mis18 se asocia a la proteína remodeladora de la cromatina BRG1, también denominada SMARCA4 (Figura 41 y 43). Este factor forma parte de numerosos complejos de la familia SWI/SNF, en los que actúa como su subunidad catalítica, y que poseen diversas funciones tales como la regulación de la expresión génica, el ensamblaje de nucleosomas, el mantenimiento de la estabilidad genómica, etc. (Trotter et al., 2008). Este complejo, además de BRG1, contiene entre 10-12 subunidades llamadas SMARCA4s (o BAFs), que especifican su función y confieren estabilidad al complejo. Tres de estos componentes reguladores: SMARCA4 (BAF47), SMARCA5 (BAF60a) y SMARCA6 (BAF57) aparecen también en los inmunoprecipitados de Mis18 (Figura 41). Estas tres subunidades también forman parte, junto a BRG1, de otros complejos implicados en el silenciamiento génico (Underhill et al., 2000) y la activación de la transcripción (Belandia & Parker, 2003). Recientemente, se ha propuesto que el homólogo de SMARCA5 en levaduras, FUN30, protege a la región centromérica de la formación de eucromatina. En su ausencia, las modificaciones de histonas típicas de eucromatina (acetilación de histonas y presencia de la variante de histona H2A, H2A.Z) invaden este dominio causando errores de segregación (Stralfors et al., 2011). Además, estos defectos correlacionan con niveles reducidos de CENP-A en el centrómero. De forma similar, se ha encontrado que la proteína FUN30 de *S. cerevisiae* contribuye al silenciamiento génico en dominios transcripcionalmente inactivos como los telómeros, el locus HMR y las repeticiones de ADN ribosómico (Neves-Costa et al., 2009). En organismos superiores, SMARCA5 está involucrado en el mantenimiento de las marcas de heterocromatina durante la progresión de la fase S (Rowbotham et al., 2011). En su ausencia, se detecta un incremento de histonas acetiladas específicamente en la cromatina del centrómero, de forma similar a lo que ocurre en ausencia de Mis18 (Figura 40), y se observan defectos en mitosis. Es posible que Mis18, a través de su interacción con BRG1 y sus subunidades asociadas, contribuya a mantener niveles bajos de acetilación en las histonas de la cromatina centromérica, evitando así la “eucromatización” de esta región. Así, la unión de Mis18 a los centrómeros al final de mitosis serviría para contrarrestar el efecto que produce la transcripción centromérica y quizá también para permitir el reconocimiento de esta región por parte del complejo HJURP/CENP-A ya que se establece una cromatina “permisiva” con un equilibrio apropiado entre las distintas modificaciones postraduccionales de las histonas centroméricas. Cuando se sobreexpresa CENP-A en células de *Drosophila* se observa la formación de

neocentrómeros preferentemente en las regiones de transición entre eucromatina, con niveles altos de acetilación de histonas y transcripción activa y heterocromatina, con histonas deacetiladas y ausencia de transcripción (Olszak et al., 2011). Un exceso de acetilación de H4 inhibe la formación de estos neocentrómeros. En *S. cerevisiae*, la hipoacetilación de H4 es importante para la incorporación de CENP-A en el centrómero y en regiones de cromatina no centromérica (Choy et al., 2011). Si nuestra hipótesis es correcta, la eliminación del complejo que forman BRG1 y SMARCAD1 produciría un defecto de localización de HJURP y, consecuentemente, un fallo en la carga de nueva CENP-A.

En definitiva, es posible que la transcripción tenga consecuencias positivas y negativas en la propagación de la identidad de los centrómeros. Entre las primeras, podría dirigir el ensamblaje y la localización de componentes necesarios para la función centromérica (CENP-C) y la incorporación de CENP-A (Mis18 y HJURP), y también facilitar el intercambio de nucleosomas H3 (H3.3 concretamente) por nucleosomas CENP-A. Sin embargo, un exceso de transcripción podría ser perjudicial y provocar la eucromatinización de la cromatina centromérica, por lo que la célula impondría restricciones a esta transcripción a través de los complejos remodeladores asociados a Mis18 (Figura 45).



**Figura 45. Posibles funciones de la transcripción centromérica.** Los transcritos de ARN centromérico pueden promover el reclutamiento de componentes del centrómero (CENP-C e INCENP) o factores necesarios para la incorporación de CENP-A (Mis18 y HJURP). Alternativamente, la acumulación de HJURP en los centrómeros puede depender de la acción de Mis18 (flecha roja) y no directamente de la transcripción. Por otro lado, un exceso de transcripción en el centrómero provocaría la pérdida de heterocromatina en esta región por lo que puede que existan mecanismos para contrarrestarla, proponemos que el complejo BRG1/SMARCAD1 es esencial en este proceso. Además, la transcripción del ADN satélite puede facilitar el desensamblaje de nucleosomas H3 por parte de factores remodelares de la cromatina y favorecer así la incorporación de nuevos nucleosomas CENP-A mediada por HJURP.

### **6.6 Importancia biológica: segregación cromosómica y cáncer:**

La pérdida del centrómero o la presencia de más de un centrómero por cromosoma genera inestabilidad cromosómica y conduce a la aneuploidía que, a su vez, causa problemas en el desarrollo embrionario y puede potenciar la aparición de tumores malignos (Weaver et al., 2007). En los últimos años, diversas investigaciones han mostrado que CENP-A y HJURP están sobreexpresados en algunos tipos de cáncer. En concreto, se han encontrado niveles elevados de CENP-A en cáncer colorrectal (Tomonaga et al., 2003), de mama (Hu et al., 2010) y de hígado (Li et al., 2011). También hay exceso de HJURP en células tumorales de pulmón (Kato et al., 2007), glioblastoma (Valente et al., 2009) y cáncer de mama (Hu et al., 2010). De hecho, este último trabajo propone que la expresión de HJURP es mejor biomarcador clínico que otros factores comúnmente utilizados tales como el índice de proliferación Ki67, ya que correlaciona mejor con la predicción de pronóstico. Además, pacientes con niveles elevados de HJURP presentan una mayor respuesta al tratamiento con radioterapia, posiblemente debido al papel de esta proteína en proliferación celular. Sin embargo, HJURP se ha relacionado también con la reparación al daño en el ADN (Kato et al., 2007) por lo que este resultado parece contradictorio. En fibroblastos humanos, la reducción de los niveles de CENP-A causa senescencia, y se ha propuesto que éste es un mecanismo de defensa para prevenir aneuploidías derivadas de los defectos en segregación cromosómica producidos por la falta de CENP-A (Maehara et al., 2010). En cualquier caso, el estudio de la función de CENP-A y HJURP en el ensamblaje del centrómero y reparación al daño en el ADN puede ser importante para comprender los mecanismos moleculares del desarrollo del cáncer y, en un futuro, mejorar la terapia contra él.

### **6.7 Perspectivas futuras:**

En los últimos años se han identificado numerosos factores implicados de un modo u otro en el proceso de incorporación de CENP-A. Sin embargo, en muchos casos no se conoce la relación entre ellos y su caracterización funcional es aún pobre. Esperamos que este trabajo contribuya a una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que regulan y dirigen dicha incorporación. En la primera parte de este estudio, hemos mostrado que la carga de CENP-A depende fundamentalmente de dos factores: condensina II y HJURP. Proponemos que condensina II contribuye a la formación de una estructura tridimensional necesaria para la retención de los nucleosomas CENP-A en la región centromérica y además facilita la incorporación de los mismos. Queda aún por investigar si este factor tiene, además, un papel directo en la localización de factores implicados en el ensamblaje del centrómero, tales como Mis18 o proteínas del CCAN. Asimismo, mostramos que la interacción directa entre CENP-A y HJURP es esencial para la incorporación de CENP-A en los centrómeros. Un estudio muy reciente (Barnhart et al., 2011) indica que HJURP media directamente el ensamblaje de los



nucleosomas CENP-A en cromatina. Sin embargo, no se sabe cómo reconoce la estructura centromérica y se une a ella. Mis18 es factor clave en este proceso, pero no hay evidencias de una interacción directa entre HJURP y Mis18, por lo que no parece que Mis18 actúe como receptor de HJURP en cromatina. Pensamos que Mis18 podría facilitar el reconocimiento de esta región por HJURP generando un patrón específico de modificaciones postraduccionales de histonas en esta región. En la segunda parte de esta tesis, mostramos que en ausencia de Mis18 se produce un aumento de las formas acetiladas de la histona H4 en el centrómero. Además, mediante análisis por espectrometría de masas de los inmunoprecipitados de Mis18 encontramos que este factor interacciona con BRG1 y componentes de la familia de remodeladores de la cromatina SWI/SNF, cuyo defecto también provoca aumento de acetilación en la región centromérica (Rowbotham et al., 2011). El siguiente paso, por tanto, es elucidar el papel de estos complejos en la localización de HJURP y carga de CENP-A. Por otro lado, observamos que la expresión ectópica de CENP-A puede provocar su acumulación en regiones de cromatina no centromérica, de forma independiente a los factores que promueven su carga en los centrómeros, Mis18 y HJURP. El estudio de los mecanismos que dirigen tal incorporación podría ser importante para comprender el efecto de la sobreexpresión de CENP-A en algunos tipos de tumores.

## **CONCLUSIONES**

## 7. CONCLUSIONES:

1. La incorporación de CENP-A tiene lugar al comienzo de interfase en extractos de huevos de *Xenopus laevis*. Esta incorporación es independiente de la replicación del ADN pero requiere el paso previo por mitosis.
2. La organización de la cromatina centrómerica mediada por el complejo condensina desempeña un papel importante en la incorporación de CENP-A. La eliminación específica de condensina II provoca la desestabilización de los nucleosomas que contienen CENP-A ya existentes en la cromatina centromérica e impide la incorporación de nuevos nucleosomas.
3. La función esencial de HJURP en la incorporación de CENP-A está conservada en *X. laevis*. Una buena parte de la histona CENP-A presente en el extracto soluble se encuentra asociada a XHJURP. Sin embargo, la localización de este factor durante el ciclo celular indica que no forma parte del nucleosoma centromérico final.
4. En células humanas, la expresión ectópica de GFP-CENPA causa su incorporación fuera del centrómero durante fase S de forma independiente a los mecanismos que regulan su asociación a los centrómeros. Sin embargo, en la siguiente fase G1, GFP-CENPA se acumula específicamente en los centrómeros. Además, en esta fase se observa una disminución en los niveles solubles de GFP-CENP-A ectópica que parece depender de la actividad del proteasoma.
5. hMis18 es un complejo formado por hMis18 $\alpha$ , hMis18 $\beta$  y M18BP1. En ausencia de este complejo, no hay incorporación de nueva CENP-A a la cromatina centromérica.
6. La localización de hMis18 está regulada en el ciclo celular, de forma que únicamente localiza en los centrómeros al comienzo de G1. La subunidad M18BP1 de este complejo se une a ARN centromérico y su presencia en la cromatina centromérica es sensible al tratamiento con *RNase A*.
7. La reducción de hMis18 causa una alteración en el patrón de modificaciones de histonas en el centrómero. En concreto, provoca un aumento de la histona H4 acetilada.
8. Se han identificado nuevos factores que interaccionan con hMis18 en cromatina, entre los que destacan condensina II y el remodelador de la cromatina BRG1.

## **BIBLIOGRAFIA**

## 8. BIBLIOGRAFIA:

- Agudo M, Abad JP, Molina I, Losada A, Ripoll P, Villasante A. A dicentric chromosome of *Drosophila melanogaster* showing alternate centromere inactivation. *Chromosoma*. 2000 Jun;109(3):190-6.
- Ahmad K, Henikoff S. Centromeres are specialized replication domains in heterochromatin. *J Cell Biol*. 2001 Apr 2;153(1):101-10
- Ahmad K, Henikoff S. Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 10;99 Suppl 4:16477-84.
- Barnhart MC, Kuich PH, Stellfox ME, Ward JA, Bassett EA, Black BE, Foltz DR. HJURP is a CENP-A chromatin assembly factor sufficient to form a functional de novo kinetochore. *J Cell Biol*. 2011 Jul 25;194(2):229-43.
- Bassett EA, Wood S, Salimian KJ, Ajith S, Foltz DR, Black BE. Epigenetic centromere specification directs aurora B accumulation but is insufficient to efficiently correct mitotic errors. *J Cell Biol*. 2010 Jul 26;190(2):177-85.
- Belandia B, Orford RL, Hurst HC, Parker MG. Targeting of SWI/SNF chromatin remodelling complexes to estrogen-responsive genes. *EMBO J*. 2002 Aug 1;21(15):4094-103.
- Bergmann JH, Rodríguez MG, Martins NM, Kimura H, Kelly DA, Masumoto H, Larionov V, Jansen LE, Earnshaw WC. Epigenetic engineering shows H3K4me2 is required for HJURP targeting and CENP-A assembly on a synthetic human kinetochore. *EMBO J*. 2011 Jan 19;30(2):328-40.
- Black BE, Brock MA, Bv©dard S, Woods VL Jr, Cleveland DW. An epigenetic mark generated by the incorporation of CENP-A into centromeric nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 20;104(12):5008-13.
- Black BE, Cleveland DW. Epigenetic centromere propagation and the nature of CENP-a nucleosomes. *Cell*. 2011 Feb 18;144(4):471-9.
- Black BE, Foltz DR, Chakravarthy S, Luger K, Woods VL Jr, Cleveland DW. Structural determinants for generating centromeric chromatin. *Nature*. 2004 Jul 29;430(6999):578-82.
- Blower MD, Karpen GH. The role of *Drosophila* CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat Cell Biol*. 2001 Aug;3(8):730-9.
- Blower MD, Sullivan BA, Karpen GH. Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Dev Cell*. 2002 Mar;2(3):319-30.
- Bouzinba-Segard H, Guais A, Francastel C. Accumulation of small murine minor satellite transcripts leads to impaired centromeric architecture and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jun 6;103(23):8709-14.
- Camahort R, Li B, Florens L, Swanson SK, Washburn MP, Gerton JL. Scm3 is essential to recruit the histone h3 variant cse4 to centromeres and to maintain a functional kinetochore. *Mol Cell*. 2007 Jun 22;26(6):853-65.
- Camahort R, Shivaraju M, Mattingly M, Li B, Nakanishi S, Zhu D, Shilatifard A, Workman JL, Gerton JL. Cse4 is part of an octameric nucleosome in budding yeast. *Mol Cell*. 2009 Sep 24;35(6):794-805.
- Campos EI, Fillingham J, Li G, Zheng H, Voigt P, Kuo WH, Seepany H, Gao Z, Day LA, Greenblatt JF, Reinberg D. The program for processing newly synthesized histones H3.1 and H4. *Nat Struct Mol Biol*. 2010 Nov;17(11):1343-51.

- Carroll CW, Milks KJ, Straight AF. Dual recognition of CENP-A nucleosomes is required for centromere assembly. *J Cell Biol.* 2010 Jun 28;189(7):1143-55.
- Carroll CW, Silva MC, Godek KM, Jansen LE, Straight AF. Centromere assembly requires the direct recognition of CENP-A nucleosomes by CENP-N. *Nat Cell Biol.* 2009 Jul;11(7):896-902.
- Castillo AG, Mellone BG, Partridge JF, Richardson W, Hamilton GL, Allshire RC, Pidoux AL. Plasticity of fission yeast CENP-A chromatin driven by relative levels of histone H3 and H4. *PLoS Genet.* 2007 Jul;3(7):e121.
- Chikashige Y, Kinoshita N, Nakaseko Y, Matsumoto T, Murakami S, Niwa O, Yanagida M. Composite motifs and repeat symmetry in *S. pombe* centromeres: direct analysis by integration of NotI restriction sites. *Cell.* 1989 Jun 2;57(5):739-51.
- Cho US, Harrison SC. Recognition of the centromere-specific histone Cse4 by the chaperone Scm3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jun 7;108(23):9367-71.
- Choi ES, Strålfors A, Castillo AG, Durand-Dubief M, Ekwall K, Allshire RC. Identification of noncoding transcripts from within CENP-A chromatin at fission yeast centromeres. *J Biol Chem.* 2011 Jul 1;286(26):23600-7.
- Choy JS, Acuña R, Au WC, Basrai MA. A Role for Histone H4K16 Hypoacetylation in *Saccharomyces cerevisiae* Kinetochore Function. *Genetics.* 2011 Jun 6.
- Clarke L, Amstutz H, Fishel B, Carbon J. Analysis of centromeric DNA in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Nov;83(21):8253-7.
- Cleveland DW, Mao Y, Sullivan KF. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell.* 2003 Feb 21;112(4):407-21.
- Collins KA, Camahort R, Seidel C, Gerton JL, Biggins S. The overexpression of a *Saccharomyces cerevisiae* centromeric histone H3 variant mutant protein leads to a defect in kinetochore biorientation. *Genetics.* 2007 Feb;175(2):513-25.
- Collins KA, Furuyama S, Biggins S. Proteolysis contributes to the exclusive centromere localization of the yeast Cse4/CENP-A histone H3 variant. *Curr Biol.* 2004 Nov 9;14(21):1968-72.
- Conde e Silva N, Black BE, Sivolob A, Filipski J, Cleveland DW, Prunell A. CENP-A-containing nucleosomes: easier disassembly versus exclusive centromeric localization. *J Mol Biol.* 2007 Jul 13;370(3):555-73.
- Corpet A, Almouzni G. Making copies of chromatin: the challenge of nucleosomal organization and epigenetic information. *Trends Cell Biol.* 2009 Jan;19(1):29-41.
- da Rosa JL, Holik J, Green EM, Rando OJ, Kaufman PD. "Overlapping regulation of CenH3 localization and histone H3 turnover by CAF-1 and HIR proteins in *Saccharomyces cerevisiae*" *Genetics.* 2011 Jan;187(1):9-19.
- Dalal Y, Wang H, Lindsay S, Henikoff S. Tetrameric structure of centromeric nucleosomes in interphase *Drosophila* cells. *PLoS Biol.* 2007 Aug;5(8):e218.
- Dimitriadis EK, Weber C, Gill RK, Diekmann S, Dalal Y. Tetrameric organization of vertebrate centromeric nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Nov 23;107(47):20317-22.
- Du J, Tian Z, Hans CS, Laten HM, Cannon SB, Jackson SA, Shoemaker RC, Ma J. Evolutionary conservation, diversity and specificity of LTR-retrotransposons in flowering plants: insights from genome-wide analysis and multi-specific comparison. *Plant J.* 2010 Aug;63(4):584-98.
- Dunleavy EM, Almouzni G, Karpen GH. H3.3 is deposited at centromeres in S phase as a placeholder for newly assembled CENP-A in G(1) phase. *Nucleus.* 2011 Mar;2(2):146-157.

- Dunleavy EM, Pidoux AL, Monet M, Bonilla C, Richardson W, Hamilton GL, Ekwall K, McLaughlin PJ, Allshire RC. A NASP (N1/N2)-related protein, Sim3, binds CENP-A and is required for its deposition at fission yeast centromeres. *Mol Cell*. 2007 Dec 28;28(6):1029-44.
- Dunleavy EM, Roche D, Tagami H, Lacoste N, Ray-Gallet D, Nakamura Y, Daigo Y, Nakatani Y, Almouzni-Pettinotti G. HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell*. 2009 May 1; 137(3):485-97.
- Earnshaw WC, Migeon BR. Three related centromere proteins are absent from the inactive centromere of a stable isodicentric chromosome. *Chromosoma*. 1985;92(4):290-6.
- Eot-Houllier G, Fulcrand G, Watanabe Y, Magnaghi-Jaulin L, Jaulin C. Histone deacetylase 3 is required for centromeric H3K4 deacetylation and sister chromatid cohesion. *Genes Dev*. 2008 Oct 1;22(19):2639-44.
- Erhardt S, Mellone BG, Betts CM, Zhang W, Karpen GH, Straight AF. Genome-wide analysis reveals a cell cycle-dependent mechanism controlling centromere propagation. *J Cell Biol*. 2008 Dec 1;183(5):805-18.
- Ferri F, Bouzinba-Segard H, Velasco G, Hubé F, Francastel C. Non-coding murine centromeric transcripts associate with and potentiate Aurora B kinase. *Nucleic Acids Res*. 2009 Aug;37(15):5071-80.
- Foltz DR, Jansen LE, Bailey AO, Yates JR 3rd, Bassett EA, Wood S, Black BE, Cleveland DW. Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell*. 2009 May 1; 137(3):472-84.
- Foltz DR, Jansen LE, Black BE, Bailey AO, Yates JR 3rd, Cleveland DW. The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nat Cell Biol*. 2006 May;8(5):458-69.
- Franklin SG, Zweidler A. Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals. *Nature*. 1977 Mar 17;266(5599):273-5.
- Fujita Y, Hayashi T, Kiyomitsu T, Toyoda Y, Kokubu A, Obuse C, Yanagida M. Priming of centromere for CENP-A recruitment by human hMis18alpha, hMis18beta, and M18BP1. *Dev Cell*. 2007 Jan;12(1):17-30.
- Furuyama T, Dalal Y, Henikoff S. Chaperone-mediated assembly of centromeric chromatin in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 18;103(16):6172-7.
- Furuyama T, Henikoff S. Centromeric nucleosomes induce positive DNA supercoils. *Cell*. 2009 Jul 10;138(1):104-13.
- Gascoigne KE, Takeuchi K, Suzuki A, Hori T, Fukagawa T, Cheeseman IM. Induced ectopic kinetochore assembly bypasses the requirement for CENP-A nucleosomes. *Cell*. 2011 Apr 29;145(3):410-22.
- Goshima G, Wollman R, Goodwin SS, Zhang N, Scholey JM, Vale RD, Stuurman N. Genes required for mitotic spindle assembly in *Drosophila* S2 cells. *Science*. 2007 Apr 20;316(5823):417-21.
- Grewal SI. RNAi-dependent formation of heterochromatin and its diverse functions. *Curr Opin Genet Dev*. 2010 Apr;20(2):134-41.
- Gunjan A, Verreault A. A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in *S. cerevisiae*. *Cell*. 2003 Nov 26;115(5):537-49.
- Hayashi T, Fujita Y, Iwasaki O, Adachi Y, Takahashi K, Yanagida M. Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres. *Cell*. 2004 Sep 17;118(6):715-29.
- Hemmerich P, Weidtkamp-Peters S, Hoischen C, Schmiedeberg L, Erliandri I, Diekmann S. Dynamics of inner kinetochore assembly and maintenance in living cells. *J Cell Biol*.

- 2008 Mar 24;180(6):1101-14.
- Henikoff S, Dalal Y. Centromeric chromatin: what makes it unique? *Curr Opin Genet Dev.* 2005 Apr;15(2):177-84.
- Heun P, Erhardt S, Blower MD, Weiss S, Skora AD, Karpen GH. Mislocalization of the *Drosophila* centromere-specific histone CID promotes formation of functional ectopic kinetochores. *Dev Cell.* 2006 Mar;10(3):303-15.
- Hewawasam G, Shivaraju M, Mattingly M, Venkatesh S, Martin-Brown S, Florens L, Workman JL, Gerton JL. Psh1 is an E3 ubiquitin ligase that targets the centromeric histone variant Cse4. *Mol Cell.* 2010 Nov 12;40(3):444-54.
- Hirano T. SMC proteins and chromosome mechanics: from bacteria to humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005 Mar 29;360(1455):507-14.
- Holland AJ, Cleveland DW. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Jul;10(7):478-87.
- Hori T, Amano M, Suzuki A, Backer CB, Welburn JP, Dong Y, McEwen BF, Shang WH, Suzuki E, Okawa K, Cheeseman IM, Fukagawa T. CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore. *Cell.* 2008 Dec 12;135(6):1039-52.
- Howman EV, Fowler KJ, Newson AJ, Redward S, MacDonald AC, Kalitsis P, Choo KH. Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Feb 1;97(3):1148-53.
- Hu H, Liu Y, Wang M, Fang J, Huang H, Yang N, Li Y, Wang J, Yao X, Shi Y, Li G, Xu RM. Structure of a CENP-A-histone H4 heterodimer in complex with chaperone HJURP. *Genes Dev.* 2011 May 1;25(9):901-6.
- Hu Z, Huang G, Sadanandam A, Gu S, Lenburg ME, Pai M, Bayani N, Blakely EA, Gray JW, Mao JH. The expression level of HJURP has an independent prognostic impact and predicts the sensitivity to radiotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010; 12(2):R18.
- Hudson DF, Marshall KM, Earnshaw WC. Condensin: Architect of mitotic chromosomes. *Chromosome Res.* 2009;17(2):131-44. Review.
- Jansen LE, Black BE, Foltz DR, Cleveland DW. Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *J Cell Biol.* 2007 Mar 12;176(6):795-805.
- Jin C, Felsenfeld G. Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes Dev.* 2007 Jun 15;21(12):1519-29.
- Kato T, Sato N, Hayama S, Yamabuki T, Ito T, Miyamoto M, Kondo S, Nakamura Y, Daigo Y. Activation of Holliday junction recognizing protein involved in the chromosomal stability and immortality of cancer cells. *Cancer Res.* 2007 Sep 15;67(18):8544-53.
- Kim T, Buratowski S. Dimethylation of H3K4 by Set1 recruits the Set3 histone deacetylase complex to 5' transcribed regions. *Cell.* 2009 Apr 17;137(2):259-72.
- Kingston IJ, Yung JS, Singleton MR. Biophysical Characterization of the Centromere-specific Nucleosome from Budding Yeast. *J Biol Chem.* 2011 Feb 4;286(5):4021-6.
- Kremer L, Alvaro-Gracia JM, Ossorio C, Avila J. Proteins responsible for anticentromere activity found in the sera of patients with CREST-associated Raynaud's phenomenon. *Clin Exp Immunol.* 1988 Jun;72(3):465-9.
- Lagana A, Dorn JF, De Rop V, Ladouceur AM, Maddox AS, Maddox PS. A small GTPase molecular switch regulates epigenetic centromere maintenance by stabilizing newly incorporated CENP-A. *Nat Cell Biol.* 2010 Dec;12(12):1186-93.



- Lermontova I, Schubert V, Fuchs J, Klatte S, Macas J, Schubert I. Loading of Arabidopsis centromeric histone CENH3 occurs mainly during G2 and requires the presence of the histone fold domain. *Plant Cell*. 2006 Oct;18(10):2443-51.
- Li Y, Zhu Z, Zhang S, Yu D, Yu H, Liu L, Cao X, Wang L, Gao H, Zhu M. ShRNA-targeted centromere protein A inhibits hepatocellular carcinoma growth. *PLoS One*. 2011 Mar 15;6(3):e17794.
- Lipp JJ, Hirota T, Poser I, Peters JM. Aurora B controls the association of condensin I but not condensin II with mitotic chromosomes. *J Cell Sci*. 2007 Apr 1;120(Pt 7):1245-55.
- Losada A, Hirano M, Hirano T. Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev*. 1998 Jul 1;12(13):1986-97.
- Losada A. The regulation of sister chromatid cohesion. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Sep;1786(1):41-8.
- Maddox PS, Hyndman F, Monen J, Oegema K, Desai A. Functional genomics identifies a Myb domain-containing protein family required for assembly of CENP-A chromatin. *J Cell Biol*. 2007 Mar 12;176(6):757-63.
- Maehara K, Takahashi K, Saitoh S. CENP-A reduction induces a p53-dependent cellular senescence response to protect cells from executing defective mitoses. *Mol Cell Biol*. 2010 May;30(9):2090-104.
- Marshall OJ, Marshall AT, Choo KH. Three-dimensional localization of CENP-A suggests a complex higher order structure of centromeric chromatin. *J Cell Biol*. 2008 Dec 29;183(7):1193-202.
- Meeks-Wagner D, Hartwell LH. Normal stoichiometry of histone dimer sets is necessary for high fidelity of mitotic chromosome transmission. *Cell*. 1986 Jan 17;44(1):43-52.
- Mellone BG, Grive KJ, Shteyn V, Bowers SR, Oderberg I, Karpen GH. Assembly of *Drosophila* centromeric chromatin proteins during mitosis. *PLoS Genet*. 2011 May;7(5):e1002068.
- Milks KJ, Moree B, Straight AF. Dissection of CENP-C-directed centromere and kinetochore assembly. *Mol Biol Cell*. 2009 Oct;20(19):4246-55.
- Mizuguchi G, Xiao H, Wisniewski J, Smith MM, Wu C. Nonhistone Scm3 and histones CenH3-H4 assemble the core of centromere-specific nucleosomes. *Cell*. 2007 Jun 15;129(6):1153-64.
- Moreno-Moreno O, Medina-Giró S, Torras-Llort M, Azorín F. The F Box Protein Partner of Paired Regulates Stability of *Drosophila* Centromeric Histone H3, CenH3(CID). *Curr Biol*. 2011 Aug 24.
- Moreno-Moreno O, Torras-Llort M, Azorín F. Proteolysis restricts localization of CID, the centromere-specific histone H3 variant of *Drosophila*, to centromeres. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(21):6247-55.
- Morey L, Barnes K, Chen Y, Fitzgerald-Hayes M, Baker RE. The histone fold domain of Cse4 is sufficient for CEN targeting and propagation of active centromeres in budding yeast. *Eukaryot Cell*. 2004 Dec;3(6):1533-43.
- Murray.A.W. (1991) Cell cycle extracts. *Methods Cell Biol* 36, 581-605.
- Nakano M, Okamoto Y, Ohzeki J, Masumoto H. Epigenetic assembly of centromeric chromatin at ectopic alpha-satellite sites on human chromosomes. *J Cell Sci*. 2003 Oct 1;116(Pt 19):4021-34.
- Neves-Costa A, Will WR, Vetter AT, Miller JR, Varga-Weisz P. The SNF2-family member Fun30 promotes gene silencing in heterochromatic loci. *PLoS One*. 2009 Dec 1;4(12):e8111.

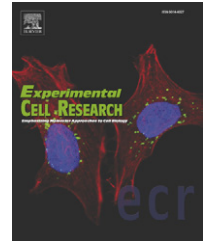
- Nezi L, Musacchio A. Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Dec;21(6):785-95.
- Obuse C, Yang H, Nozaki N, Goto S, Okazaki T, Yoda K. Proteomics analysis of the centromere complex from HeLa interphase cells: UV-damaged DNA binding protein1 (DDB-1) is a component of the CEN-complex, while BMI-1 is transiently co-localized with the centromeric region in interphase. *Genes Cells.* 2004 Feb;9(2):105-20.
- Okada M, Cheeseman IM, Hori T, Okawa K, McLeod IX, Yates JR 3rd, Desai A, Fukagawa T. The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres. *Nat Cell Biol.* 2006 May;8(5):446-57.
- Okada M, Okawa K, Isobe T, Fukagawa T. CENP-H-containing complex facilitates centromere deposition of CENP-A in cooperation with FACT and CHD1. *Mol Biol Cell.* 2009 Sep;20(18):3986-95.
- Oliveira RA, Coelho PA, Sunkel CE. The condensin I subunit Barren/CAP-H is essential for the structural integrity of centromeric heterochromatin during mitosis. *Mol Cell Biol.* 2005 Oct;25(20):8971-84.
- Olszak AM, van Essen D, Pereira AJ, Diehl S, Manke T, Maiato H, Saccani S, Heun P. Heterochromatin boundaries are hotspots for de novo kinetochore formation. *Nat Cell Biol.* 2011 Jun 19;13(7):799-808.
- Ono T, Fang Y, Spector DL, Hirano T. Spatial and temporal regulation of Condensins I and II in mitotic chromosome assembly in human cells. *Mol Biol Cell.* 2004 Jul;15(7):3296-308.
- Palmer DK, O'Day K, Wener MH, Andrews BS, Margolis RL. A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J Cell Biol.* 1987 Apr;104(4):805-15.
- Pearson CG, Yeh E, Gardner M, Odde D, Salmon ED, Bloom K. Stable kinetochore-microtubule attachment constrains centromere positioning in metaphase. *Curr Biol.* 2004 Nov 9;14(21):1962-7.
- Perpelescu M, Nozaki N, Obuse C, Yang H, Yoda K. Active establishment of centromeric CENP-A chromatin by RSF complex. *J Cell Biol.* 2009 May 4;185(3):397-407.
- Philpott A, Leno GH. Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in *Xenopus* egg extracts. *Cell.* 1992 May 29;69(5):759-67.
- Philpott A, Yew PR. The *Xenopus* cell cycle: an overview. *Mol Biotechnol.* 2008 May;39(1):9-19.
- Pidoux AL, Choi ES, Abbott JK, Liu X, Kagansky A, Castillo AG, Hamilton GL, Richardson W, Rappsilber J, He X, Allshire RC. Fission yeast Scm3: A CENP-A receptor required for integrity of subkinetochore chromatin. *Mol Cell.* 2009 Feb 13; 33(3):299-311.
- Pluta AF, Mackay AM, Ainsztein AM, Goldberg IG, Earnshaw WC. The centromere: hub of chromosomal activities. *Science.* 1995 Dec 8;270(5242):1591-4.
- Podhraski V, Campo-Fernandez B, Wörle H, Piatti P, Niederegger H, Böck G, Fyodorov DV, Lusser A. CenH3/CID incorporation is not dependent on the chromatin assembly factor CHD1 in *Drosophila*. *PLoS One.* 2010 Apr 9;5(4):e10120.
- Prasad P, Ekwall K. New insights into how chromatin remodellers direct CENP-A to centromeres. *EMBO J.* 2011 May 18;30(10):1875-6.
- Przewłoka MR, Venkei Z, Bolanos-Garcia VM, Debski J, Dadlez M, Glover DM. CENP-C Is a Structural Platform for Kinetochore Assembly. *Curr Biol.* 2011 Mar 8;21(5):399-405.

- Quivy JP, Grandi P, Almouzni G. Dimerization of the largest subunit of chromatin assembly factor 1: importance in vitro and during *Xenopus* early development. *EMBO J.* 2001 Apr 17;20(8):2015-27.
- Ranjitkar P, Press MO, Yi X, Baker R, MacCoss MJ, Biggins S. An E3 ubiquitin ligase prevents ectopic localization of the centromeric histone H3 variant via the centromere targeting domain. *Mol Cell.* 2010 Nov 12;40(3):455-64.
- Ray-Gallet D, Quivy JP, Scamps C, Martini EM, Lipinski M, Almouzni G. HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol Cell.* 2002 May;9(5):1091-100.
- Régnier V, Vagnarelli P, Fukagawa T, Zerjal T, Burns E, Trouche D, Earnshaw W, Brown W. CENP-A is required for accurate chromosome segregation and sustained kinetochore association of BubR1. *Mol Cell Biol.* 2005 May;25(10):3967-81.
- Ribeiro SA, Vagnarelli P, Dong Y, Hori T, McEwen BF, Fukagawa T, Flors C, Earnshaw WC. A super-resolution map of the vertebrate kinetochore. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jun 8;107(23):10484-9.
- Rowbotham SP, Barki L, Neves-Costa A, Santos F, Dean W, Hawkes N, Choudhary P, Will WR, Webster J, Oxley D, Green CM, Varga-Weisz P, Mermoud JE. Maintenance of silent chromatin through replication requires SWI/SNF-like chromatin remodeler SMARCAD1. *Mol Cell.* 2011 May 6;42(3):285-96.
- Salvany L, Aldaz S, Corsetti E, Azpiazu N. A new role for hth in the early pre-blastodermic divisions in *Drosophila*. *Cell Cycle.* 2009 Sep 1;8(17):2748-55.
- Samoshkin A, Arnaoutov A, Jansen LE, Ouspenski I, Dye L, Karpova T, McNally J, Dasso M, Cleveland DW, Strunnikov A. Human condensin function is essential for centromeric chromatin assembly and proper sister kinetochore orientation. *PLoS One.* 2009 Aug 28;4(8):e6831.
- Sanchez-Pulido L, Pidoux AL, Ponting CP, Allshire RC. Common ancestry of the CENP-A chaperones Scm3 and HJURP. *Cell.* 2009 Jun 26;137(7):1173-4.
- Schittenhelm RB, Althoff F, Heidmann S, Lehner CF. Detrimental incorporation of excess Cenp-A/Cid and Cenp-C into *Drosophila* centromeres is prevented by limiting amounts of the bridging factor Cal1. *J Cell Sci.* 2010 Nov 1;123 (21):3768-79.
- Schmidt A, Rauh NR, Nigg EA, Mayer TU. Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold. *J Cell Sci.* 2006 Apr 1;119(Pt 7):1213-8.
- Schuh M, Lehner CF, Heidmann S. Incorporation of *Drosophila* CID/CENP-A and CENP-C into centromeres during early embryonic anaphase. *Curr Biol.* 2007 Feb 6;17(3):237-43.
- Screpanti E, De Antoni A, Alushin GM, Petrovic A, Melis T, Nogales E, Musacchio A. Direct binding of Cenp-C to the Mis12 complex joins the inner and outer kinetochore. *Curr Biol.* 2011 Mar 8;21(5):391-8.
- Sekulic N, Bassett EA, Rogers DJ, Black BE. The structure of (CENP-A-H4)<sub>2</sub> reveals physical features that mark centromeres. *Nature.* 2010 Sep 16;467(7313):347-51.
- Shamu CE, Murray AW. Sister chromatid separation in frog egg extracts requires DNA topoisomerase II activity during anaphase. *J Cell Biol.* 1992 Jun;117(5):921-34.
- Shelby RD, Monier K, Sullivan KF. Chromatin assembly at kinetochores is uncoupled from DNA replication. *J Cell Biol.* 2000 Nov 27;151(5):1113-8.
- Shelby RD, Vafa O, Sullivan KF. Assembly of CENP-A into centromeric chromatin requires a cooperative array of nucleosomal DNA contact sites. *J Cell Biol.* 1997 Feb 10;136(3):501-13.

- Shintomi K, Hirano T. The relative ratio of condensin I to II determines chromosome shapes. *Genes Dev.* 2011 Jul 15;25(14):1464-9.
- Shivaraju M, Camahort R, Mattingly M, Gerton JL. Scm3 is a centromeric nucleosome assembly factor. *J Biol Chem.* 2011 Apr 8;286(14):12016-23.
- Shuaib M, Ouarrhni K, Dimitrov S, Hamiche A. HJURP binds CENP-A via a highly conserved N-terminal domain and mediates its deposition at centromeres. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jan 26;107(4):1349-54.
- Sims RJ 3rd, Chen CF, Santos-Rosa H, Kouzarides T, Patel SS, Reinberg D. Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *J Biol Chem.* 2005 Dec 23;280(51):41789-92.
- Smith S, Stillman B. Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro. *Cell.* 1989 Jul 14;58(1):15-25.
- Stoler S, Keith KC, Curnick KE, Fitzgerald-Hayes M. A mutation in CSE4, an essential gene encoding a novel chromatin-associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis. *Genes Dev.* 1995 Mar 1;9(5):573-86.
- Stoler S, Rogers K, Weitze S, Morey L, Fitzgerald-Hayes M, Baker RE. Scm3, an essential *Saccharomyces cerevisiae* centromere protein required for G2/M progression and Cse4 localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jun 19;104(25):10571-6.
- Strålfors A, Walfridsson J, Bhuiyan H, Ekwall K. The FUN30 chromatin remodeler, Fft3, protects centromeric and subtelomeric domains from euchromatin formation. *PLoS Genet.* 2011 Mar;7(3):e1001334.
- Sullivan BA, Karpen GH. Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol.* 2004 Nov;11(11):1076-83.
- Sullivan KF, Hechenberger M, Masri K. Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *J Cell Biol.* 1994 Nov;127(3):581-92.
- Suzuki A, Hori T, Nishino T, Usukura J, Miyagi A, Morikawa K, Fukagawa T. Spindle microtubules generate tension-dependent changes in the distribution of inner kinetochore proteins. *J Cell Biol.* 2011 Apr 4;193(1):125-40.
- Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell.* 2004 Jan 9;116(1):51-61.
- Takayama Y, Sato H, Saitoh S, Ogiyama Y, Masuda F, Takahashi K. Biphasic incorporation of centromeric histone CENP-A in fission yeast. *Mol Biol Cell.* 2008 Feb;19(2):682-90.
- Tomonaga T, Matsushita K, Yamaguchi S, Oohashi T, Shimada H, Ochiai T, Yoda K, Nomura F. Overexpression and mistargeting of centromere protein-A in human primary colorectal cancer. *Cancer Res.* 2003 Jul 1; 63(13):3511-6.
- Topp CN, Zhong CX, Dawe RK. Centromere-encoded RNAs are integral components of the maize kinetochore. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Nov 9;101(45):15986-91.
- Torras-Llort M, Medina-Giró S, Moreno-Moreno O, Azorín F. A conserved arginine-rich motif within the hypervariable N-domain of *Drosophila* centromeric histone H3 (CenH3) mediates BubR1 recruitment. *PLoS One.* 2010 Oct 29;5(10):e13747.
- Trotter KW, Archer TK. The BRG1 transcriptional coregulator. *Nucl Recept Signal.* 2008 Feb 1;6:e004.

- Underhill C, Qutob MS, Yee SP, Torchia J. A novel nuclear receptor corepressor complex, N-CoR, contains components of the mammalian SWI/SNF complex and the corepressor KAP-1. *J Biol Chem*. 2000 Dec 22;275(51):40463-70.
- Van Hooser AA, Ouspenski II, Gregson HC, Starr DA, Yen TJ, Goldberg ML, Yokomori K, Earnshaw WC, Sullivan KF, Brinkley BR. Specification of kinetochore-forming chromatin by the histone H3 variant CENP-A. *J Cell Sci*. 2001 Oct;114(Pt 19):3529-42.
- Vernarecci S, Ornaghi P, Bâgu A, Cundari E, Ballario P, Filetici P. Gcn5p plays an important role in centromere kinetochore function in budding yeast. *Mol Cell Biol*. 2008 Feb;28(3):988-96.
- Vigneron S, Prieto S, Bernis C, Labbé JC, Castro A, Lorca T. Kinetochore localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom?. *Mol Biol Cell*. 2004 Oct;15(10):4584-96.
- Walfridsson J, Bjerling P, Thalen M, Yoo EJ, Park SD, Ekwall K. The CHD remodeling factor Hrp1 stimulates CENP-A loading to centromeres. *Nucleic Acids Res*. 2005 May 20;33(9):2868-79.
- Weaver BA, Cleveland DW. Aneuploidy: instigator and inhibitor of tumorigenesis. *Cancer Res*. 2007 Nov 1;67(21):10103-5.
- Westermann S, Drubin DG, Barnes G. Structures and functions of yeast kinetochore complexes. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:563-91.
- Williams JS, Hayashi T, Yanagida M, Russell P. Fission yeast Scm3 mediates stable assembly of Cnp1/CENP-A into centromeric chromatin. *Mol Cell*. 2009 Feb 13; 33(3):287-98.
- Wong LH, Brettingham-Moore KH, Chan L, Quach JM, Anderson MA, Northrop EL, Hannan R, Saffery R, Shaw ML, Williams E, Choo KH. Centromere RNA is a key component for the assembly of nucleoproteins at the nucleolus and centromere. *Genome Res*. 2007 Aug;17(8):1146-60.
- Wu C, Bassett A, Travers A. A variable topology for the 30-nm chromatin fibre. *EMBO Rep*. 2007 Dec;8(12):1129-34.
- Xiao H, Mizuguchi G, Wisniewski J, Huang Y, Wei D, Wu C. Nonhistone Scm3 Binds to AT-Rich DNA to Organize Atypical Centromeric Nucleosome of Budding Yeast. *Mol Cell*. 2011 Aug 5;43(3):369-80.
- Yong-Gonzalez V, Wang BD, Butylin P, Ouspenski I, Strunnikov A. Condensin function at centromere chromatin facilitates proper kinetochore tension and ensures correct mitotic segregation of sister chromatids. *Genes Cells*. 2007 Sep;12(9):1075-90.
- Zeitlin SG, Baker NM, Chapados BR, Soutoglou E, Wang JY, Berns MW, Cleveland DW. Double-strand DNA breaks recruit the centromeric histone CENP-A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 15;106(37):15762-7.
- Zeitlin SG, Patel S, Kavli B, Slupphaug G. *Xenopus* CENP-A assembly into chromatin requires base excision repair proteins. *DNA Repair (Amst)*. 2005 Jul;12(4):760-72.
- Zeitlin SG, Shelby RD, Sullivan KF. CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *J Cell Biol*. 2001 Dec 24;155(7):1147-57.
- Zhou Z, Feng H, Zhou BR, Ghirlando R, Hu K, Zwolak A, Miller Jenkins LM, Xiao H, Tjandra N, Wu C, Bai Y. Structural basis for recognition of centromere histone variant CenH3 by the chaperone Scm3. *Nature*. 2011 Apr 14;472(7342):234-7.

## **ANEXO**

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)[www.elsevier.com/locate/yexcr](http://www.elsevier.com/locate/yexcr)

## Review

# Epigenetic specification of centromeres by CENP-A

Rafael Bernad, Patricia Sánchez, Ana Losada\*

Chromosome Dynamics Group, Molecular Oncology Programme, Spanish National Cancer Research Center (CNIO),  
Melchor Fernández Almagro 3, Madrid, E-28029, Spain

## ARTICLE INFORMATION

### Article Chronology:

Received 29 June 2009

Revised version received 28 July 2009

Accepted 29 July 2009

Available online 3 August 2009

### Keywords:

Centromere

Kinetochore

Chromosome segregation

Chromatin assembly

## ABSTRACT

Centromeres are the chromosomal loci that direct the formation of the kinetochores. These macromolecular assemblies mediate the interaction between chromosomes and spindle microtubules and thereby power chromosome movement during cell division. They are also the sites of extensive regulation of the chromosome segregation process. Except in the case of budding yeast, centromere identity does not rely on DNA sequence but on the presence of a special nucleosome that contains a histone H3 variant known as CenH3 or CENP-A (Centromere Protein A). It has been therefore proposed that CENP-A is the epigenetic mark of the centromere. Upon DNA replication the mark is diluted two-fold and must be replenished to maintain centromere identity. What distinguishes CENP-A nucleosomes from those containing histone H3, how CENP-A nucleosomes are incorporated specifically into centromeric chromatin, and how this incorporation is coordinated with other cell cycle events are key issues that have been the focus of intensive research over the last decade. Here we review some of the highlights of this research.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Contents

Introduction . . . . .	3234
Composition of centromeric chromatin . . . . .	3234
What makes CENP-A unique? . . . . .	3234
Composition of CENP-A nucleosomes . . . . .	3234
Histone modifications at centromeres . . . . .	3235
Timing of CENP-A deposition: coordination with other cell cycle events . . . . .	3235
When does CENP-A deposition occur? . . . . .	3235
Regulation of CENP-A by proteolysis. . . . .	3235
A mitotic event is required for CENP-A incorporation. . . . .	3236
The mechanism of CENP-A deposition. . . . .	3236
Histone chaperones and CENP-A deposition. . . . .	3236
Directing CENP-A to centromeres: chromatin modifiers and heterochromatin . . . . .	3237
Chromatin remodelers at centromeric chromatin . . . . .	3238
Conclusions/perspectives . . . . .	3238
Acknowledgments . . . . .	3238
References . . . . .	3238

\* Corresponding author. Fax: +34 917328033.  
E-mail address: [alosada@cnio.es](mailto:alosada@cnio.es) (A. Losada).

## Introduction

The centromere/kinetochore complex orchestrates chromosome segregation and, along with telomeres and origins of replication, constitutes a key element to ensure faithful propagation of the genome. After the cloning of the first centromere sequence from *Saccharomyces cerevisiae* by Clarke and Carbon [1], many researchers tried to identify a similar “magic sequence” in other organisms. However, the complexity of centromere sequences became clear upon their discovery in *Schizosaccharomyces pombe* [2,3]. Fission yeast centromeres are 50–100 kb long, in contrast to 125 bp in budding yeast, and contain a complex arrangement of repeated sequences. This difference in sequence organization led Pluta et al. to distinguish between *point centromeres* (those of *S. cerevisiae*) and *regional centromeres* (those of *S. pombe*) [4]. The presence of repeated sequences appears to be a characteristic of most centromeres analyzed to date from plants, flies and humans [5–7]. Importantly, centromeres form at a subset of these repetitive DNA arrays and thus the site of kinetochore assembly appears to be determined by factors other than DNA sequence alone. Indeed, early studies revealed the epigenetic nature of centromeres. In dicentric chromosomes (i.e., carrying two centromeres) only one of them is active for recruitment of kinetochore proteins while the other is inactivated [8,9]. Steiner and Clarke [10] showed that a nonfunctional centromere present on a circular minichromosome could be converted to a functional one without changes in the content, structural arrangement or chemical modification state of the DNA. Strong evidence supporting that a particular DNA sequence is neither necessary nor sufficient for centromere specification comes from the existence of neocentromeres that arise at otherwise acentric fragments resulting from a chromosome rearrangement. These neocentromeres are devoid of the repeated sequences found at canonical centromeres but recruit most of the centromeric and pericentromeric proteins required for proper chromosome segregation [11].

What, if not DNA sequence, determines the site of kinetochore assembly? Increasing experimental evidence suggests that chromatin composition and organization play a major role in centromere specification and propagation [12–14]. Centromere Protein A, CENP-A, is a histone H3 variant that replaces canonical histone H3 in the centromeric nucleosomes of all eukaryotes [15–19]. Inactivation or down regulation of CENP-A in different experimental systems results in chromosome segregation defects and eventually cell death, and its presence is required for assembly of all other centromeric proteins [20–26]. It has been therefore proposed that CENP-A is the epigenetic mark of the centromere. Although we are far from understanding the molecular determinants of this mark and its inheritance, recent studies have provided exciting clues that we summarize in this review.

## Composition of centromeric chromatin

### What makes CENP-A unique?

CENP-A localizes specifically at active centromeres, although its overexpression can lead to promiscuous localization all over the chromosomes [27–29]. This 17-kDa histone variant displays over 60% sequence identity to canonical H3 over the C-terminal domain

that includes the “histone fold” domain (HFD) [15]. In contrast, the N-terminal region of CENP-A shares the flexible nature of histone tails but shows little amino acid sequence similarity to H3 or any other histone variant, and it is highly variable both in length and amino acid sequence among different organisms [30]. Domain swapping experiments suggested that the structural element that targets human CENP-A specifically to centromeres resides in the HFD [16]. This was shown to be the case also for budding yeast CENP-A [31]. Using hydrogen/deuterium exchange coupled to mass-spectrometry analyses, it was found that nucleosomes containing human CENP-A have a more rigid conformation than H3 nucleosomes [32]. The domain conferring conformational rigidity consists of the  $\alpha 2$  helix and the preceding loop 1 (L1) linker within the HFD and represents the surface of interaction between CENP-A and H4. Substitution of this region, known as the CENP-A targeting domain (CATD), into histone H3 is sufficient to direct it to centromeres and this chimeric histone can rescue the viability of CENP-A depleted cells [33,34]. These results indicate that the CATD not only targets CENP-A to centromeres but also creates a structural singularity in the centromeric chromatin that can be used as scaffold for the binding of other kinetochore components and thereby propagate the epigenetic mark from one generation to the next. One such component could be Centromere Protein N (CENP-N), which binds *in vitro* reconstituted CENP-A nucleosomes and chimeric CATD-containing histone H3 nucleosomes, but not H3 nucleosomes [35]. Very recently, CENP-A nucleosomes assembled *in vitro* have been shown to wrap DNA in a right-handed manner, opposite to the left-handed wrapping of H3 nucleosomes [36]. Whether the CATD of CENP-A also contributes to this property remains to be addressed.

### Composition of CENP-A nucleosomes

The composition of the CENP-A nucleosomes is still unclear. The simplest model is that CENP-A forms homotypic octamers in which the two molecules of H3 are replaced by CENP-A [37]. CENP-A shows a preference for self-association even in the presence of high amounts of the potential competitor H3 [38]. A recent report, however, has proposed that CENP-A might exist as a tetramer with H4, H2A and H2B in *Drosophila melanogaster* interphase cells based on results from cross-linking studies as well as the observation of CENP-A nucleosomes of half the height of the canonical nucleosome by atomic force microscopy [39]. It remains to be clarified whether these tetramers constitute the architectural basis of a kinetochore at mitosis or are intermediates that result from octamer splitting during DNA replication. They could also result from the intrinsic instability of CENP-A octamers observed in *in vitro* studies comparing the properties of purified CENP-A and H3 nucleosomes assembled onto a DNA fragment [40]. The easier disassembly of CENP-A nucleosomes could facilitate the clearance of those promiscuously incorporated into euchromatic regions, while disassembly would be counterbalanced by some property of centromeric chromatin [41].

A single nucleosome containing CENP-A is found at the kinetochore of *S. cerevisiae* [42]. This nucleosome is also unusual in that a non-histone protein, Scm3, appears to replace histones H2A–H2B [43,44]. Scm3 was shown to promote centromeric targeting of CENP-A through its binding to Ndc10, an inner kinetochore component that recognizes a specific sequence of budding yeast centromeres [45]. The interaction between Scm3



and CENP-A requires the HFD of CENP-A and an essential heptad repeat domain of Scm3 [46]. This domain is conserved in fungi, so its function may not be restricted to point centromeres. In fact, in the regional centromeres of *S. pombe* Scm3 is also essential for CENP-A incorporation, although in this case there is no evidence for Scm3 being part of the centromeric nucleosome, and instead, it has been proposed to act as a deposition factor (see below) [47,48].

### **Histone modifications at centromeres**

The flexible N-terminal tails of histones are susceptible of a number of post-translational modifications that include phosphorylation, acetylation, methylation and ubiquitination. The only modification of CENP-A described to date is the phosphorylation of Serine 7 in human cells by Aurora B. This modification occurs in mitosis and has been implicated in promoting the proper localization of Aurora B and the PP1 $\gamma$  protein phosphatase upon exit from mitosis, but its relevance for CENP-A deposition has not been tested [49]. The fact that the N-terminal domain seems to be dispensable for CENP-A targeting argues against the possibility that modifications of this domain are required for proper localization and function [33].

Blocks of CENP-A and H3 nucleosomes are linearly interspersed on extended chromatin fibers from human and *Drosophila* cells, and CENP-A is close to H3 nucleosomes in polynucleosomal preparations [50]. These centromeric H3 nucleosomes lack marks characteristic of heterochromatin, such as di- and trimethylation of H3 at lysine 9, and instead contain marks usually found in open chromatin, like dimethylation of H3 at lysine 4, although they are hypoacetylated [51,52]. This unique combination of post-translational modifications, distinct from both euchromatin and heterochromatin, may demarcate a region of open chromatin within pericentric heterochromatin that facilitates the targeting of CENP-A while preventing its spreading out of the centromere.

The histone variants macroH2A and H2A.Z have been found in close association to CENP-A in human cells, suggesting that CENP-A nucleosomes are enriched in these variants [53]. In contrast, H2A.Z appears to be present in the H3-containing nucleosomes interspersed with CENP-A nucleosomes in mouse centromeres where it has been proposed to contribute to the higher order organization of the centromeric chromatin maybe by enhancing the stability of centromeric nucleosomes [54,55]. Some evidences suggest that this function could be conserved in fission yeast [56]. Finally, DNA methylation may also contribute to the epigenetic determination of the centromeric chromatin, at least in plants [57].

## **Timing of CENP-A deposition: coordination with other cell cycle events**

### **When does CENP-A deposition occur?**

Maintenance of centromere identity requires incorporation of new CENP-A during or after replication of centromeric DNA. In *S. cerevisiae*, all pre-existing CENP-A is replaced by newly synthesized CENP-A during S phase [58] whereas in *S. pombe*, two pathways of CENP-A deposition exist at different times of the cell cycle, S phase and G2 [59,60]. Experiments in *Arabidopsis thaliana*

suggest that most CENP-A is loaded in G2 by a replication-independent mechanism [61]. Early studies in human cells also showed that deposition of CENP-A is uncoupled from DNA replication: while centromere duplication takes place in mid-to-late S phase, CENP-A levels are low at this time and increase during G2 [62]. Unexpectedly, it was recently demonstrated that the incorporation of newly synthesized CENP-A occurs in fact in telophase/early G1 in human cells [41,63]. Similarly, CENP-A incorporates in anaphase in the fast cycles of *Drosophila* syncytial embryos [64]. However, in *Drosophila* Kc cells, GFP-tagged CENP-A was detected in metaphase cells 2 h after induction of its expression, implying that incorporation occurred at some point between the preceding G2 and metaphase [65]. Thus, the timing of deposition of new CENP-A within the cell cycle may be variable not only among different species, but also in different developmental stages within the same species. Another corollary of these results is that any factor that alters cell cycle progression may indirectly affect CENP-A incorporation and therefore, special attention must be paid to the cell cycle stage when analyzing the regulation of this process.

One major consequence of the deposition timing is the actual composition of centromeric chromatin at the time of building a functional kinetochore in mitosis. In those cases in which the CENP-A mark, diluted two-fold during duplication of the genome, is not replenished until the subsequent G1, centromeric chromatin contains half the full complement of CENP-A [63]. Furthermore, upon passage of the replication fork through centromeres, it is supposed that CENP-A nucleosomes are randomly segregated to daughter strands, and either histone H3 nucleosomes are incorporated at this time and later exchanged, or nucleosome-free gaps are left between the pre-existing CENP-A nucleosomes until the next G1. In the former case, alternation of CENP-A and H3 containing nucleosomes may be important for proper folding of centromeric chromatin and kinetochore assembly. In this regard, it is interesting to note that CENP-T/CENP-W, a complex that is essential for the kinetochore localization of CCAN (Constitutive Centromere-Associated Network) components like CENP-H, has been proposed to associate with H3 nucleosomes in close proximity to CENP-A nucleosomes [66]. If, on the other hand, nucleosome-free regions are left close to the parental CENP-A nucleosomes, they could facilitate the binding of factors important for CENP-A deposition, stabilization, or function, or facilitate transcription of the region.

### **Regulation of CENP-A by proteolysis**

Regulation of CENP-A levels throughout the cell cycle may contribute to its specific deposition at centromeres. Results in budding and fission yeast suggest that the balance between histones H3 and H4 and CENP-A is important for centromeric chromatin assembly [67,68]. The GATA-like transcription factor Ams2, a key factor in CENP-A deposition during S phase in *S. pombe*, appears to work, at least in part, through the regulation of transcription of core histones [59]. As mentioned above, CENP-A mRNA and protein start to accumulate in mid-S phase and peak in G2 in human cells [38,62]. Interestingly, in cells overexpressing CENP-A, the ectopic protein incorporates throughout the chromatin in interphase [28,29,38,69]. By the next G1, however, misincorporated CENP-A seems to have been cleared from chromatin by a mechanism that likely involves ubiquitin-mediated

proteolysis, as suggested by experiments in yeast and *Drosophila* cells [28,70]. This proteolysis could be initiated on chromatin and the machinery involved could be specifically excluded from centromeric regions. Alternatively, misincorporated CENP-A nucleosomes may dissociate more easily than those properly localized and be subsequently degraded in the nucleoplasm [40]. The particular protein machinery responsible for CENP-A proteolysis remains unknown, although DDB1 (Damaged DNA Binding protein), a protein that serves as an adaptor for different E3 ubiquitin ligases, has been identified associated with CENP-A in interphase chromatin [71]. In human cells, soluble CENP-A is found associated to HJURP (Holliday Junction Recognizing Protein), a protein required for its deposition (see below). Depletion of HJURP leads to a significant decrease in CENP-A levels, suggesting that HJURP protects the fraction of CENP-A that is going to be incorporated at centromeres in G1 while the remaining “free” CENP-A is targeted for degradation to prevent its untimely incorporation throughout chromatin [72,73].

### ***A mitotic event is required for CENP-A incorporation***

Cell fusion experiments in human cells showed that passage through mitosis is a prerequisite to CENP-A loading in G1 [63]. It has been proposed that accomplishing the task of segregating chromosomes could somehow signal the initiation of centromere assembly [74]. This could explain the effect of depleting some centromere/kinetochore components on CENP-A incorporation [75,76]. However, normal loading is observed upon exit from mitosis without proper chromosome segregation, a condition achieved by nocodazole treatment of spindle checkpoint-defective human cells and *Drosophila* embryos [63,64]. The strongest candidates for regulating CENP-A deposition in *S. pombe* and human cells, described in the next section (HJURP, Scm3 and the Mis18 complex) cannot be detected on mitotic chromosomes but bind to centromeres in G1, coinciding with the time of loading. Thus, the mitotic requirement is unlikely to be related to a mitosis-specific modification of these factors. Instead, passage through mitosis could prime centromeric chromatin to allow incorporation of CENP-A later. The priming factor could recognize and act upon a mitosis-specific configuration of the centromeric chromatin imposed by chromosome condensation and/or kinetochore assembly. It will be therefore interesting to investigate the impact of depleting factors involved in mitotic chromosome architecture like cohesin, condensin and topoisomerase II on the subsequent loading step [77].

## **The mechanism of CENP-A deposition**

### ***Histone chaperones and CENP-A deposition***

Despite their sequence and structural similarities, histone H3 variants are deposited by distinct chaperones: histone H3.1 is deposited by the Chromatin Assembly Factor 1 (CAF-1) complex during replication and DNA damage processing, while histone H3.3 is deposited at active chromatin by a complex containing the HIRA protein in a process independent of DNA synthesis [78]. Some evidences suggested that these two complexes may contribute to CENP-A deposition in yeast, but neither of them could be detected in association with CENP-A in human cells

[53,72,73,79,80]. In principle, components common to CAF-1 and HIRA complexes could be good candidates to be part of a putative CENP-A loading complex [81]. One such component is RbAp46/48, a histone chaperone found in many chromatin-modifying complexes [78]. In fission yeast and human cells, RbAp46/48 was indeed shown to be required for CENP-A loading [82]. Furthermore, RbAp48 co-purified with H4 and CENP-A in *Drosophila* and these three components were sufficient to assemble nucleosomes on naked DNA. This led to the proposal of an exclusion model in which CAF-1 and HIRA complexes would have a disadvantage in relation to the RbAp48-H4-CENP-A complex at centromeres that would lead to CENP-A being passively retained [83]. Although beautiful for its simplicity, this model lacks *in vivo* experimental support. Also in *Drosophila*, a RNAi-based genome wide search for CENP-A localization determinants identified CAL1 and CENP-C [84]. CENP-A, CAL-1 and CENP-C co-immunoprecipitate and are mutually dependent for centromere targeting and function, but the molecular mechanisms underlying these dependencies remain to be clarified. No homologs for CAL1 have been described in other organisms.

In humans, several purification approaches led to the identification of constitutive centromeric components or CENPs and associated factors whose presence at centromeres depends on CENP-A [53,71,85]. Their precise roles in centromere specification and kinetochore assembly and function are being unraveled [35,66,86]. In the case of the CENP-I, K, M complex (CENP-I being the homolog to *S. pombe* Mis6, one of the first regulators of CENP-A loading to be identified), there is interdependency between the complex and CENP-A in terms of centromere targeting and/or maintenance [75,87]. Very recently, two independent groups identified HJURP as a partner of pre-deposited CENP-A by means of affinity purification and mass-spectrometry analysis. Histone H4, Nucleophosmin 1 (NPM1) and RbAp48 (the latter only in one of the studies) were also identified in this non nucleosomal complex. HJURP is required to promote deposition of human CENP-A in human cells, and recognizes the CATD of CENP-A. Furthermore, it localizes to centromeres at the time of CENP-A loading [72,73]. All these evidences make HJURP the likely CENP-A specific chaperone although its molecular mechanism of action remains to be elucidated. Interestingly, HJURP had been previously implicated in double strand break repair and shown to bind Holliday junction-like DNA *in vitro* [88], and base excision repair proteins have been proposed to contribute to CENP-A loading in *Xenopus* extracts [89]. We speculate that mitotic recombination of centromeric sequences, a process known to occur both in yeast and mammalian cells, could be a source of unresolved junctions recognized by HJURP upon exit from mitosis [90,91]. Alternatively, DNA breaks could arise from the late resolution of catenanes in anaphase, as centromeric DNA is severely stretched, and be repaired in a process coupled to CENP-A loading with the participation of HJURP [92,93].

Is the function of HJURP conserved in other organisms? The fission yeast homologue of *S. cerevisiae* Scm3 could be functionally related to HJURP. It interacts with CENP-A, localizes to centromeres during most of the cell cycle (except in mitosis) and is essential for CENP-A deposition [47,48]. Sequence analysis indeed suggests the presence of a common domain in these proteins [94]. Another chaperone known as Sim3, related to NASP (N1/N2), interacts also with non-chromosomal CENP-A and is required for its incorporation in *S. pombe*. It has been proposed that Sim3 could

behave as an escort chaperone handing off CENP-A to Scm3, a function that human HJURP may fulfill by itself [47,60,73].

### Directing CENP-A to centromeres: chromatin modifiers and heterochromatin

As described above, soluble complexes are in charge of CENP-A deposition in different organisms. However, the determinants for the specific loading of CENP-A at centromeric loci are unclear. Centromeric chromatin proteins, including CENP-A itself, or a

specific histone modification pattern may contribute to this specificity by promoting a chromatin status permissive for CENP-A deposition and maintenance or, alternatively, by preventing CENP-A eviction. *S. pombe* Mis18, a protein found to interact with Mis16 (RbAp46/48) and to be required for CENP-A loading, helps maintaining the hypoacetylated state of histones in the centromere central domain [82]. The human homologues of Mis18, hMis18 $\alpha$  and hMis18 $\beta$ , form a complex with RbAp46/48 and a myb/SANT domain containing protein, M18BP/KNL-2, and are also essential for CENP-A loading [95,96]. In fission yeast, Mis16 and

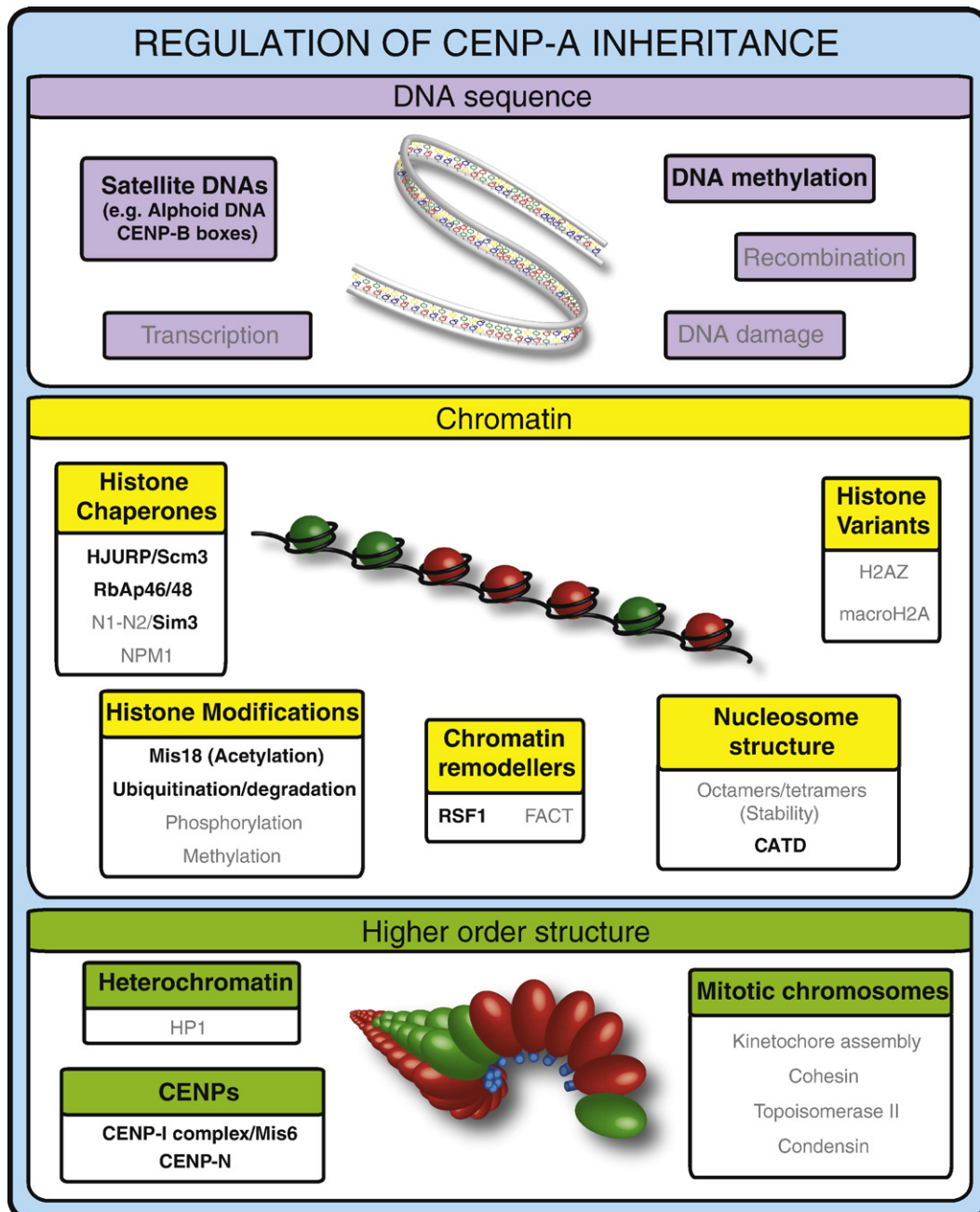


Fig. 1 – Factors that contribute to CENP-A inheritance. The factors that are mentioned throughout the text are here grouped according to three levels of DNA organization: DNA sequence, nucleosomal DNA (chromatin) and higher order chromatin structure. Those factors whose role in the CENP-A loading process has experimental support are shown in bold black letters whereas those whose role is more speculative appear in grey. CENP-A containing nucleosomes are represented in green, H3 nucleosome are in red, and histone H1 is depicted as a blue cylinder.

Mis18 are required for centromeric localization of Scm3 [47,48]. In human cells, Mis18 is targeted to centromeres upon exit from mitosis and precedes HJURP but a dependency of HJURP binding on Mis18 function has not been demonstrated [73,95]. Intriguingly, downregulation of Mis18 causes a severe defect in CENP-A loading that can be alleviated by treatment with Trichostatin A (TSA), an inhibitor of histone deacetylases [95], suggesting that the Mis18 complex promotes histone acetylation in human cells. These results seem at odds with the results in fission yeast, probably reflecting the differences in the complexity of the centromeric region between both organisms. Alternatively, a putative priming role of centromeric chromatin by Mis18 may parallel the CENP-A loading event in terms of its cell cycle regulation and thus differ in the two systems (see previous section). Further experiments will be needed to clarify how Mis18 regulates the acetylation state of centromeric histones (or some other protein) and how this is important for CENP-A deposition.

Why are most regional centromeres surrounded by heterochromatin? Incorporation of CENP-A *de novo* into the central domain of naïve minichromosome templates in fission yeast requires the assembly of heterochromatin domains on flanking *otr* repeats mediated by the RNA interference machinery [97]. This machinery affects also neocentromere activation upon deletion of the canonical centromere [98]. Recent studies with a human artificial chromosome (HAC)-based system in which the epigenetic state of the centromeric chromatin can be manipulated show that induction of heterochromatin formation leads to CENP-A loss and is incompatible with kinetochore activity [14]. Okada et al. had previously shown that the alphoid satellite repeats present in the HAC must contain the binding motif of CENP-B [99]. However, if the alphoid satellite is integrated on a chromosome arm, then CENP-B prevents CENP-A incorporation by promoting heterochromatinization of the region thus avoiding generation of a dicentric chromosome. A similar “surveillance” role of CENP-B to prevent genome instability is observed in fission yeast, where CENP-B homologues silence retrotransposons by promoting heterochromatinization [100]. Thus, heterochromatin may represent a physical barrier for the spreading of CENP-A while at the same time it may provide an appropriate environment for centromeric chromatin function (e.g., by promoting sister chromatid cohesion) [101,102].

### Chromatin remodelers at centromeric chromatin

Both subunits of the FACT chromatin remodeler were found in independent purifications of CENP-A associated complexes [53,85]. FACT is known to destabilize nucleosomes to facilitate transcription [103] and the DNA unwinding function of the *Xenopus* homolog is required for replication [104]. In fission yeast, FACT was recently shown to promote centromeric-heterochromatin integrity and accurate chromosome segregation [105]. The functional relationship between FACT and CENP-A remains to be determined. One possibility is that FACT just cooperates on replication of the centromeric region by unwinding an otherwise compact chromosomal domain. Alternatively, it may play a more active role on CENP-A nucleosome deposition and/or maintenance, either by facilitating transcription of centromeric sequences or influencing nucleosome dynamics. Importantly, a second ATP-dependent nucleosome remodeling factor that favors transcription initiation of a chromatin template *in vitro* along with FACT, RSF1,

was also identified in the immunoprecipitates of CENP-A [71,85,106]. This complex associates with centromeres in mid-G1 and its depletion leads to a significant decrease in the amount of CENP-A present at centromeres upon high salt wash [107]. It has been proposed that the concerted action of FACT and RSF1 may mediate the stable incorporation of CENP-A nucleosomes into centromeric chromatin, maybe after its HJURP-directed arrival.

### Conclusions/perspectives

Our knowledge on how centromere identity is propagated from one generation to the next has increased enormously over the last decade. Many factors have been identified that interact with CENP-A physically and/or genetically, and a number of them have been shown to affect the incorporation or stabilization of CENP-A at centromeres (Fig. 1). However, the exact role of most of these factors remains unknown. The development of an *in vitro* assay for CENP-A incorporation from purified components would be extremely useful to understand in detail their mechanism of action. Meanwhile, the study of different model organisms will contribute to our understanding of the basic rules underlying the molecular requirements of CENP-A deposition and maintenance and how they have been modified through evolution. Do the rules change also throughout development or in different cell types? *Parascaris* is a remarkable example of an organism showing different centromere/kinetochore organization in different cell types [108]. In *Caenorhabditis elegans*, CENP-A is essential for mitosis but dispensable for meiosis [109]. Is this a particularity of holocentric chromosomes? The study of neocentromeres or repositioned centromeres, as well as artificial chromosomes, will continue to provide important clues on the regulation of centromeric chromatin assembly. The role of specific heterochromatin binding proteins and histone modifications both in *de novo* establishment and in inheritance of the CENP-A domain must be addressed. Also, the intriguing connection between CENP-A loading and DNA repair needs to be clarified. Clearly, an exciting future lies ahead for centromere research.

### Acknowledgments

We thank Juan Méndez (CNIO) and members of the lab for critically reading the manuscript, and colleagues in the field for helpful discussions. We apologize to those whose work is not cited due to space limitations. Research in our lab is supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (grants BFU2007-66627 and CSD2007-0015, and FPI predoctoral fellowship to P.S.), Fundación Caja Madrid, the Epigenome Network of Excellence (EU) and EMBO (postdoctoral fellowship ALTF 77-2007 to R.B.).

### REFERENCES

- [1] L. Clarke, J. Carbon, Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes, *Nature* 287 (1980) 504–509.
- [2] Y. Chikashige, N. Kinoshita, Y. Nakaseko, T. Matsumoto, S. Murakami, O. Niwa, M. Yanagida, Composite motifs and repeat symmetry in *S. pombe* centromeres: direct analysis by integration of NotI restriction sites, *Cell* 57 (1989) 739–751.



- [3] L. Clarke, H. Amstutz, B. Fishel, J. Carbon, Analysis of centromeric DNA in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83 (1986) 8253–8257.
- [4] A.F. Pluta, A.M. Mackay, A.M. Ainsztein, I.G. Goldberg, W.C. Earnshaw, The centromere: hub of chromosomal activities, *Science* 270 (1995) 1591–1594.
- [5] M.G. Schueler, A.W. Higgins, M.K. Rudd, K. Gustashaw, H.F. Willard, Genomic and genetic definition of a functional human centromere, *Science* 294 (2001) 109–115.
- [6] G.P. Copenhagen, K. Nickel, T. Kuromori, M.I. Benito, S. Kaul, X. Lin, M. Bevan, G. Murphy, B. Harris, L.D. Parnell, W.R. McCombie, R.A. Martienssen, M. Marra, D. Preuss, Genetic definition and sequence analysis of Arabidopsis centromeres, *Science* 286 (1999) 2468–2474.
- [7] X. Sun, J. Wahlstrom, G. Karpen, Molecular structure of a functional *Drosophila* centromere, *Cell* 91 (1997) 1007–1019.
- [8] W.C. Earnshaw, B.R. Migeon, Three related centromere proteins are absent from the inactive centromere of a stable isodicentric chromosome, *Chromosoma* 92 (1985) 290–296.
- [9] M. Agudo, J.P. Abad, I. Molina, A. Losada, P. Ripoll, A. Villasante, A dicentric chromosome of *Drosophila melanogaster* showing alternate centromere inactivation, *Chromosoma* 109 (2000) 190–196.
- [10] N.C. Steiner, L. Clarke, A novel epigenetic effect can alter centromere function in fission yeast, *Cell* 79 (1994) 865–874.
- [11] O.J. Marshall, A.C. Chueh, L.H. Wong, K.H. Choo, Neocentromeres: new insights into centromere structure, disease development, and karyotype evolution, *Am. J. Hum. Genet.* 82 (2008) 261–282.
- [12] P.E. Warburton, C.A. Cooke, S. Bourassa, O. Vafa, B.A. Sullivan, G. Stetten, G. Gimelli, D. Warburton, C. Tyler-Smith, K.F. Sullivan, G.G. Poirier, W.C. Earnshaw, Immunolocalization of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres, *Curr. Biol.* 7 (1997) 901–904.
- [13] M. Baum, K. Sanyal, P.K. Mishra, N. Thaler, J. Carbon, Formation of functional centromeric chromatin is specified epigenetically in *Candida albicans*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 14877–14882.
- [14] M. Nakano, S. Cardinale, V.N. Noskov, R. Gassmann, P. Vagnarelli, S. Kandels-Lewis, V. Larionov, W.C. Earnshaw, H. Masumoto, Inactivation of a human kinetochore by specific targeting of chromatin modifiers, *Dev. Cell.* 14 (2008) 507–522.
- [15] D.K. Palmer, K. O'Day, M.H. Wener, B.S. Andrews, R.L. Margolis, A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones, *J. Cell. Biol.* 104 (1987) 805–815.
- [16] K.F. Sullivan, M. Hechenberger, K. Masri, Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere, *J. Cell. Biol.* 127 (1994) 581–592.
- [17] B.J. Buchwitz, K. Ahmad, L.L. Moore, M.B. Roth, S. Henikoff, A histone-H3-like protein in *C. elegans*, *Nature* 401 (1999) 547–548.
- [18] S. Henikoff, K. Ahmad, J.S. Platero, B. van Steensel, Heterochromatic deposition of centromeric histone H3-like proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 716–721.
- [19] P.B. Meluh, P. Yang, L. Glowczewski, D. Koshland, M.M. Smith, Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell* 94 (1998) 607–613.
- [20] S. Stoler, K.C. Keith, K.E. Curnick, M. Fitzgerald-Hayes, A mutation in CSE4, an essential gene encoding a novel chromatin-associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis, *Genes Dev.* 9 (1995) 573–586.
- [21] K. Takahashi, E.S. Chen, M. Yanagida, Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A-like protein in fission yeast, *Science* 288 (2000) 2215–2219.
- [22] E.V. Howman, K.J. Fowler, A.J. Newson, S. Redward, A.C. MacDonald, P. Kalitsis, K.H. Choo, Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 1148–1153.
- [23] K. Oegema, A. Desai, S. Rybina, M. Kirkham, A.A. Hyman, Functional analysis of kinetochore assembly in *Caenorhabditis elegans*, *J. Cell. Biol.* 153 (2001) 1209–1226.
- [24] M.D. Blower, G.H. Karpen, The role of *Drosophila* CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions, *Nat. Cell. Biol.* 3 (2001) 730–739.
- [25] V. Regnier, P. Vagnarelli, T. Fukagawa, T. Zerjal, E. Burns, D. Trouche, W. Earnshaw, W. Brown, CENP-A is required for accurate chromosome segregation and sustained kinetochore association of BubR1, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 3967–3981.
- [26] S.T. Liu, J.B. Rattner, S.A. Jablonski, T.J. Yen, Mapping the assembly pathways that specify formation of the trilaminar kinetochore plates in human cells, *J. Cell. Biol.* 175 (2006) 41–53.
- [27] A.A. Van Hooser, Ouspenskiy, H.C. Gregson, D.A. Starr, T.J. Yen, M.L. Goldberg, K. Yokomori, W.C. Earnshaw, K.F. Sullivan, B.R. Brinkley, Specification of kinetochore-forming chromatin by the histone H3 variant CENP-A, *J. Cell. Sci.* 114 (2001) 3529–3542.
- [28] O. Moreno-Moreno, M. Torras-Llort, F. Azorin, Proteolysis restricts localization of CID, the centromere-specific histone H3 variant of *Drosophila*, to centromeres, *Nucleic. Acids. Res.* 34 (2006) 6247–6255.
- [29] P. Heun, S. Erhardt, M.D. Blower, S. Weiss, A.D. Skora, G.H. Karpen, Mislocalization of the *Drosophila* centromere-specific histone CID promotes formation of functional ectopic kinetochores, *Dev. Cell.* 10 (2006) 303–315.
- [30] S. Henikoff, Y. Dalal, Centromeric chromatin: what makes it unique? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15 (2005) 177–184.
- [31] L. Morey, K. Barnes, Y. Chen, M. Fitzgerald-Hayes, R.E. Baker, The histone fold domain of Cse4 is sufficient for CEN targeting and propagation of active centromeres in budding yeast, *Eukaryot. Cell.* 3 (2004) 1533–1543.
- [32] B.E. Black, M.A. Brock, S. Bedard, V.L. Woods Jr., D.W. Cleveland, An epigenetic mark generated by the incorporation of CENP-A into centromeric nucleosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 5008–5013.
- [33] B.E. Black, L.E. Jansen, P.S. Maddox, D.R. Foltz, A.B. Desai, J.V. Shah, D.W. Cleveland, Centromere identity maintained by nucleosomes assembled with histone H3 containing the CENP-A targeting domain, *Mol. Cell.* 25 (2007) 309–322.
- [34] B.E. Black, D.R. Foltz, S. Chakravathy, K. Luger, V.L. Woods Jr., D.W. Cleveland, Structural determinants for generating centromeric chromatin, *Nature* 430 (2004) 578–582.
- [35] C.W. Carroll, M.C. Silva, K.M. Godek, L.E. Jansen, A.F. Straight, Centromere assembly requires the direct recognition of CENP-A nucleosomes by CENP-N, *Nat. Cell. Biol.* 11 (2009) 896–902.
- [36] T. Furuyama, S. Henikoff, Centromeric nucleosomes induce positive DNA supercoils, *Cell* 138 (2009) 104–113.
- [37] K. Yoda, S. Ando, S. Morishita, K. Houmura, K. Hashimoto, K. Takeyasu, T. Okazaki, Human centromere protein A, (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 7266–7271.
- [38] R.D. Shelby, O. Vafa, K.F. Sullivan, Assembly of CENP-A into centromeric chromatin requires a cooperative array of nucleosomal DNA contact sites, *J. Cell. Biol.* 136 (1997) 501–513.
- [39] Y. Dalal, H. Wang, S. Lindsay, S. Henikoff, Tetrameric structure of centromeric nucleosomes in interphase *Drosophila* cells, *PLoS. Biol.* 5 (2007) e218.
- [40] N. Conde e Silva, B.E. Black, A. Sivolob, J. Filipski, D.W. Cleveland, A. Prunell, CENP-A-containing nucleosomes: easier disassembly versus exclusive centromeric localization, *J. Mol. Biol.* 370 (2007) 555–573.
- [41] P. Hemmerich, S. Weidtkamp-Peters, C. Hoischen, L. Schmiedeberg, I. Erliandri, S. Diekmann, Dynamics of inner kinetochore assembly and maintenance in living cells, *J. Cell. Biol.* 180 (2008) 1101–1114.

- [42] S. Furuyama, S. Biggins, Centromere identity is specified by a single centromeric nucleosome in budding yeast, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 14706–14711.
- [43] G. Mizuguchi, H. Xiao, J. Wisniewski, M.M. Smith, C. Wu, Nonhistone Scm3 and histones CenH3-H4 assemble the core of centromere-specific nucleosomes, *Cell* 129 (2007) 1153–1164.
- [44] S. Stoler, K. Rogers, S. Weitze, L. Morey, M. Fitzgerald-Hayes, R.E. Baker, Scm3, an essential *Saccharomyces cerevisiae* centromere protein required for G2/M progression and Cse4 localization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 10571–10576.
- [45] S. Westermann, D.G. Drubin, G. Barnes, Structures and functions of yeast kinetochore complexes, *Annu. Rev. Biochem.* 76 (2007) 563–591.
- [46] R. Camahort, B. Li, L. Florens, S.K. Swanson, M.P. Washburn, J.L. Gerton, Scm3 is essential to recruit the histone h3 variant cse4 to centromeres and to maintain a functional kinetochore, *Mol. Cell.* 26 (2007) 853–865.
- [47] A.L. Pidoux, E.S. Choi, J.K. Abbott, X. Liu, A. Kagansky, A.G. Castillo, G.L. Hamilton, W. Richardson, J. Rappsilber, X. He, R.C. Allshire, Fission yeast Scm3: a CENP-A receptor required for integrity of subkinetochore chromatin, *Mol. Cell.* 33 (2009) 299–311.
- [48] J.S. Williams, T. Hayashi, M. Yanagida, P. Russell, Fission yeast Scm3 mediates stable assembly of Cnp1/CENP-A into centromeric chromatin, *Mol. Cell.* 33 (2009) 287–298.
- [49] S.G. Zeitlin, R.D. Shelby, K.F. Sullivan, CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis, *J. Cell. Biol.* 155 (2001) 1147–1157.
- [50] M.D. Blower, B.A. Sullivan, G.H. Karpen, Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans, *Dev. Cell.* 2 (2002) 319–330.
- [51] B.A. Sullivan, G.H. Karpen, Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 (2004) 1076–1083.
- [52] H. Yan, H. Ito, K. Nobuta, S. Ouyang, W. Jin, S. Tian, C. Lu, R.C. Venu, G.L. Wang, P.J. Green, R.A. Wing, C.R. Buell, B.C. Meyers, J. Jiang, Genomic and genetic characterization of rice Cen3 reveals extensive transcription and evolutionary implications of a complex centromere, *Plant. Cell.* 18 (2006) 2123–2133.
- [53] D.R. Foltz, L.E. Jansen, B.E. Black, A.O. Bailey, J.R. Yates III, D.W. Cleveland, The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex, *Nat. Cell. Biol.* 8 (2006) 458–469.
- [54] I.K. Greaves, D. Rangasamy, P. Ridgway, D.J. Tremethick, H2A.Z contributes to the unique 3D structure of the centromere, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 525–530.
- [55] Y.J. Park, P.N. Dyer, D.J. Tremethick, K. Luger, A new fluorescence resonance energy transfer approach demonstrates that the histone variant H2AZ stabilizes the histone octamer within the nucleosome, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 24274–24282.
- [56] S. Ahmed, B. Dul, X. Qiu, N.C. Walworth, Msc1 acts through histone H2A.Z to promote chromosome stability in *Schizosaccharomyces pombe*, *Genetics* 177 (2007) 1487–1497.
- [57] W. Zhang, H.R. Lee, D.H. Koo, J. Jiang, Epigenetic modification of centromeric chromatin: hypomethylation of DNA sequences in the CENH3-associated chromatin in *Arabidopsis thaliana* and maize, *Plant. Cell.* 20 (2008) 25–34.
- [58] C.G. Pearson, E. Yeh, M. Gardner, D. Odde, E.D. Salmon, K. Bloom, Stable kinetochore-microtubule attachment constrains centromere positioning in metaphase, *Curr. Biol.* 14 (2004) 1962–1967.
- [59] Y. Takayama, H. Sato, S. Saitoh, Y. Ogiyama, F. Masuda, K. Takahashi, Biphasic incorporation of centromeric histone CENP-A in fission yeast, *Mol. Biol. Cell.* 19 (2008) 682–690.
- [60] E.M. Dunleavy, A.L. Pidoux, M. Monet, C. Bonilla, W. Richardson, G.L. Hamilton, K. Ekwali, P.J. McLaughlin, R.C. Allshire, A. NASP, (N1/N2)-related protein, Sim3, binds CENP-A and is required for its deposition at fission yeast centromeres, *Mol. Cell.* 28 (2007) 1029–1044.
- [61] I. Lermontova, V. Schubert, J. Fuchs, S. Klatte, J. Macas, I. Schubert, Loading of Arabidopsis centromeric histone CENH3 occurs mainly during G2 and requires the presence of the histone fold domain, *Plant. Cell.* 18 (2006) 2443–2451.
- [62] R.D. Shelby, K. Monier, K.F. Sullivan, Chromatin assembly at kinetochores is uncoupled from DNA replication, *J. Cell. Biol.* 151 (2000) 1113–1118.
- [63] L.E. Jansen, B.E. Black, D.R. Foltz, D.W. Cleveland, Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis, *J. Cell. Biol.* 176 (2007) 795–805.
- [64] M. Schuh, C.F. Lehner, S. Heidmann, Incorporation of Drosophila CID/CENP-A and CENP-C into centromeres during early embryonic anaphase, *Curr. Biol.* 17 (2007) 237–243.
- [65] K. Ahmad, S. Henikoff, Centromeres are specialized replication domains in heterochromatin, *J. Cell. Biol.* 153 (2001) 101–110.
- [66] T. Hori, M. Amano, A. Suzuki, C.B. Backer, J.P. Welburn, Y. Dong, B.F. McEwen, W.H. Shang, E. Suzuki, K. Okawa, I.M. Cheeseman, T. Fukagawa, CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore, *Cell* 135 (2008) 1039–1052.
- [67] W.C. Au, M.J. Crisp, S.Z. DeLuca, O.J. Rando, M.A. Basrai, Altered dosage and mislocalization of histone H3 and Cse4p lead to chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 179 (2008) 263–275.
- [68] A.G. Castillo, B.G. Mellone, J.F. Partridge, W. Richardson, G.L. Hamilton, R.C. Allshire, A.L. Pidoux, Plasticity of fission yeast CENP-A chromatin driven by relative levels of histone H3 and H4, *PLoS Genet.* 3 (2007) e121.
- [69] A.A. Van Hooser, M.A. Mancini, C.D. Allis, K.F. Sullivan, B.R. Brinkley, The mammalian centromere: structural domains and the attenuation of chromatin modeling, *FASEB J.* 13 (Suppl. 2) (1999) S216–S220.
- [70] K.A. Collins, S. Furuyama, S. Biggins, Proteolysis contributes to the exclusive centromere localization of the yeast Cse4/CENP-A histone H3 variant, *Curr. Biol.* 14 (2004) 1968–1972.
- [71] C. Obuse, H. Yang, N. Nozaki, S. Goto, T. Okazaki, K. Yoda, Proteomics analysis of the centromere complex from HeLa interphase cells: UV-damaged DNA binding protein 1 (DDB-1) is a component of the CEN-complex, while BMI-1 is transiently co-localized with the centromeric region in interphase, *Genes Cells.* 9 (2004) 105–120.
- [72] E.M. Dunleavy, D. Roche, H. Tagami, N. Lacoste, D. Ray-Gallet, Y. Nakamura, Y. Daigo, Y. Nakatani, G. Almouzni-Pettinotti, HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres, *Cell* 137 (2009) 485–497.
- [73] D.R. Foltz, L.E. Jansen, A.O. Bailey, J.R. Yates III, E.A. Bassett, S. Wood, B.E. Black, D.W. Cleveland, Centromere-specific assembly of CENP-A nucleosomes is mediated by HJURP, *Cell* 137 (2009) 472–484.
- [74] R.C. Allshire, G.H. Karpen, Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat. Rev. Genet.* 9 (2008) 923–937.
- [75] M. Okada, I.M. Cheeseman, T. Hori, K. Okawa, I.X. McLeod, J.R. Yates III, A. Desai, T. Fukagawa, The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres, *Nat. Cell. Biol.* 8 (2006) 446–457.
- [76] S.L. Kline, I.M. Cheeseman, T. Hori, T. Fukagawa, A. Desai, The human Mis12 complex is required for kinetochore assembly and proper chromosome segregation, *J. Cell. Biol.* 173 (2006) 9–17.
- [77] A. Losada, T. Hirano, Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins, *Genes Dev.* 19 (2005) 1269–1287.
- [78] L. De Koning, A. Corpet, J.E. Haber, G. Almouzni, Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14 (2007) 997–1007.
- [79] J.A. Sharp, A.A. Franco, M.A. Osley, P.D. Kaufman, Chromatin assembly factor I and Hir proteins contribute to building functional kinetochores in *S. cerevisiae*, *Genes Dev.* 16 (2002) 85–100.

- [80] J. Walfridsson, P. Bjerling, M. Thalen, E.J. Yoo, S.D. Park, K. Ekwall, The CHD remodeling factor Hrp1 stimulates CENP-A loading to centromeres, *Nucleic. Acids Res.* 33 (2005) 2868–2879.
- [81] H. Tagami, D. Ray-Gallet, G. Almouzni, Y. Nakatani, Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis, *Cell* 116 (2004) 51–61.
- [82] T. Hayashi, Y. Fujita, O. Iwasaki, Y. Adachi, K. Takahashi, M. Yanagida, Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres, *Cell* 118 (2004) 715–729.
- [83] T. Furuyama, Y. Dalal, S. Henikoff, Chaperone-mediated assembly of centromeric chromatin in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 6172–6177.
- [84] S. Erhardt, B.G. Mellone, C.M. Betts, W. Zhang, G.H. Karpen, A.F. Straight, Genome-wide analysis reveals a cell cycle-dependent mechanism controlling centromere propagation, *J. Cell. Biol.* 183 (2008) 805–818.
- [85] H. Izuta, M. Ikeno, N. Suzuki, T. Tomonaga, N. Nozaki, C. Obuse, Y. Kisu, N. Goshima, F. Nomura, N. Nomura, K. Yoda, Comprehensive analysis of the ICEN (Interphase Centromere Complex) components enriched in the CENP-A chromatin of human cells, *Genes Cells.* 11 (2006) 673–684.
- [86] T. Hori, M. Okada, K. Maenaka, T. Fukagawa, CENP-O class proteins form a stable complex and are required for proper kinetochore function, *Mol. Biol. Cell.* 19 (2008) 843–854.
- [87] S. Saitoh, K. Takahashi, M. Yanagida, Mis6, a fission yeast inner centromere protein, acts during G1/S and forms specialized chromatin required for equal segregation, *Cell* 90 (1997) 131–143.
- [88] T. Kato, N. Sato, S. Hayama, T. Yamabuki, T. Ito, M. Miyamoto, S. Kondo, Y. Nakamura, Y. Daigo, Activation of Holliday junction recognizing protein involved in the chromosomal stability and immortality of cancer cells, *Cancer Res.* 67 (2007) 8544–8553.
- [89] S.G. Zeitlin, S. Patel, B. Kavli, G. Slupphaug, *Xenopus* CENP-A assembly into chromatin requires base excision repair proteins, *DNA. Repair. (Amst).* 4 (2005) 760–772.
- [90] S.W. Liebman, L.S. Symington, T.D. Petes, Mitotic recombination within the centromere of a yeast chromosome, *Science* 241 (1988) 1074–1077.
- [91] I. Jaco, A. Canela, E. Vera, M.A. Blasco, Centromere mitotic recombination in mammalian cells, *J. Cell. Biol.* 181 (2008) 885–892.
- [92] K.L. Chan, P.S. North, I.D. Hickson, BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges, *EMBO J.* 26 (2007) 3397–3409.
- [93] L.H. Wang, T. Schwarzbraun, M.R. Speicher, E.A. Nigg, Persistence of DNA threads in human anaphase cells suggests late completion of sister chromatid decatenation, *Chromosoma* 117 (2008) 123–135.
- [94] L. Sánchez-Pulido, A.L. Pidoux, C.P. Ponting, R.C. Allshire, Common ancestry of the CENP-A chaperones Scm3 and HJURP, *Cell* 137 (2009) 1173–1174.
- [95] Y. Fujita, T. Hayashi, T. Kiyomitsu, Y. Toyoda, A. Kokubu, C. Obuse, M. Yanagida, Priming of centromere for CENP-A recruitment by human hMis18alpha, hMis18beta, and M18BP1, *Dev. Cell.* 12 (2007) 17–30.
- [96] P.S. Maddox, F. Hyndman, J. Monen, K. Oegema, A. Desai, Functional genomics identifies a Myb domain-containing protein family required for assembly of CENP-A chromatin, *J. Cell. Biol.* 176 (2007) 757–763.
- [97] H.D. Folco, A.L. Pidoux, T. Urano, R.C. Allshire, Heterochromatin and RNAi are required to establish CENP-A chromatin at centromeres, *Science* 319 (2008) 94–97.
- [98] K. Ishii, Y. Ogiyama, Y. Chikashige, S. Soejima, F. Masuda, T. Kakuma, Y. Hiraoka, K. Takahashi, Heterochromatin integrity affects chromosome reorganization after centromere dysfunction, *Science* 321 (2008) 1088–1091.
- [99] T. Okada, J. Ohzeki, M. Nakano, K. Yoda, W.R. Brinkley, V. Larionov, H. Masumoto, CENP-B controls centromere formation depending on the chromatin context, *Cell* 131 (2007) 1287–1300.
- [100] H.P. Cam, K. Noma, H. Ebina, H.L. Levin, S.I. Grewal, Host genome surveillance for retrotransposons by transposon-derived proteins, *Nature* 451 (2008) 431–436.
- [101] K.A. Maggert, G.H. Karpen, The activation of a neocentromere in *Drosophila* requires proximity to an endogenous centromere, *Genetics* 158 (2001) 1615–1628.
- [102] A.L. Lam, C.D. Boivin, C.F. Bonney, M.K. Rudd, B.A. Sullivan, Human centromeric chromatin is a dynamic chromosomal domain that can spread over noncentromeric DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 4186–4191.
- [103] R. Belotserkovskaya, S. Oh, V.A. Bondarenko, G. Orphanides, V.M. Studitsky, D. Reinberg, FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration, *Science* 301 (2003) 1090–1093.
- [104] K. Okuhara, K. Ohta, H. Seo, M. Shioda, T. Yamada, Y. Tanaka, N. Dohmae, Y. Seyama, T. Shibata, H. Murofushi, A DNA unwinding factor involved in DNA replication in cell-free extracts of *Xenopus* eggs, *Curr. Biol.* 9 (1999) 341–350.
- [105] E. Lejeune, M. Bortfeld, S.A. White, A.L. Pidoux, K. Ekwall, R.C. Allshire, A.G. Ladurner, The chromatin-remodeling factor FACT contributes to centromeric heterochromatin independently of RNAi, *Curr. Biol.* 17 (2007) 1219–1224.
- [106] G. LeRoy, G. Orphanides, W.S. Lane, D. Reinberg, Requirement of RSF and FACT for transcription of chromatin templates in vitro, *Science* 282 (1998) 1900–1904.
- [107] M. Perpelescu, N. Nozaki, C. Obuse, H. Yang, K. Yoda, Active establishment of centromeric CENP-A chromatin by RSF complex, *J. Cell. Biol.* 185 (2009) 397–407.
- [108] C. Goday, J.M. Gonzalez-Garcia, M.R. Esteban, G. Giovinozzo, S. Pimpinelli, Kinetochores and chromatin diminution in early embryos of *Parascaris univalens*, *J. Cell. Biol.* 118 (1992) 23–32.
- [109] J. Monen, P.S. Maddox, F. Hyndman, K. Oegema, A. Desai, Differential role of CENP-A in the segregation of holocentric *C. elegans* chromosomes during meiosis and mitosis, *Nat. Cell. Biol.* 7 (2005) 1248–1255.

# *Xenopus* HJURP and condensin II are required for CENP-A assembly

Rafael Bernad,<sup>1</sup> Patricia Sánchez,<sup>1</sup> Teresa Rivera,<sup>1</sup> Miriam Rodríguez-Corsino,<sup>1</sup> Ekaterina Boyarchuk,<sup>2</sup> Isabelle Vassias,<sup>2</sup> Dominique Ray-Gallet,<sup>2</sup> Alexei Arnaoutov,<sup>3</sup> Mary Dasso,<sup>3</sup> Geneviève Almouzni,<sup>2</sup> and Ana Losada<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chromosome Dynamics Group, Molecular Oncology Programme, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), 28029 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Laboratory of Nuclear Dynamics and Genome Plasticity, UMR218 Centre National de la Recherche Scientifique/Institut Curie, 75248 Paris Cedex 05, France

<sup>3</sup>Laboratory of Gene Regulation and Development, National Institute for Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892

Centromeric protein A (CENP-A) is the epigenetic mark of centromeres. CENP-A replenishment is necessary in each cell cycle to compensate for the dilution associated to DNA replication, but how this is achieved mechanistically is largely unknown. We have developed an assay using *Xenopus* egg extracts that can recapitulate the spatial and temporal specificity of CENP-A deposition observed in human cells, providing us with a robust in vitro system amenable to molecular dissection. Here we show that this deposition depends on *Xenopus* Holliday junction-recognizing protein (xHJURP), a member

of the HJURP/Scm3 family recently identified in yeast and human cells, further supporting the essential role of these chaperones in CENP-A loading. Despite little sequence homology, human HJURP can substitute for xHJURP. We also report that condensin II, but not condensin I, is required for CENP-A assembly and contributes to retention of centromeric CENP-A nucleosomes both in mitosis and interphase. We propose that the chromatin structure imposed by condensin II at centromeres enables CENP-A incorporation initiated by xHJURP.

## Introduction

Faithful segregation of the genome requires that chromosomes interact and are pulled by the spindle microtubules during cell division. This is made possible by the kinetochore, a macromolecular assembly built at a single locus in each chromosome known as the centromere (Cleveland et al., 2003; Musacchio and Salmon, 2007). The DNA sequence of this locus is not conserved among eukaryotes and in most cases is even different between the chromosomes of the same organism. What all centromeres have in common are nucleosomes containing a unique histone H3 variant, centromeric protein A (CENP-A; Malik and Henikoff, 2003; Allshire and Karpen, 2008). As any other histone variant, or histone modification, the amount of CENP-A present at centromeres is diluted twofold during DNA replication, and must be replenished to maintain centromere identity. How CENP-A is deposited specifically at centromeres and when this happens has been the subject of many studies in different model organisms over the last decade (Bernad et al., 2009). In budding yeast, a 125-bp sequence present in all

chromosomes determines the position in which a single CENP-A-containing nucleosome is assembled (Furuyama and Biggins, 2007). Newly synthesized CENP-A replaces old protein during DNA replication in this organism (Pearson et al., 2001). Fission yeast centromeres are more complex regions of 30–120 kb containing repetitive DNA elements (Clarke et al., 1986). CENP-A is deposited at a 3–5-kb central core element within these regions during S phase and G2, by apparently distinct pathways (Hayashi et al., 2004; Takayama et al., 2008). Plant and metazoan centromeres are embedded in repeated DNA sequences. Loading of CENP-A in *Arabidopsis* occurs mainly in G2 (Lermontova et al., 2007). A study in *Drosophila* Kc cells reported that a CENP-A deposition pathway, independent of replication, is active throughout the cell cycle (Ahmad and Henikoff, 2001). In contrast, replenishment of the CENP-A mark occurs in anaphase in the syncytial mitosis of early embryos (Schuh et al., 2007). In HeLa cells, CENP-A deposition takes place in late telophase/early G1, although it requires passage

Correspondence to Ana Losada: alosada@cnio.es

Abbreviations used in this paper: CAF-1, chromatin assembly factor 1; CENP-A, centromeric protein A; CSF, cytosolic factor; HIRA, histone regulator A; HJURP, Holliday junction-recognizing protein.

© 2011 Bernad et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

Supplemental Material can be found at:  
<http://jcb.rupress.org/content/suppl/2011/02/14/jcb.201005136.DC1.html>



through mitosis (Jansen et al., 2007; Hemmerich et al., 2008). Thus, the timing of CENP-A deposition varies among species and even in different developmental stages.

Another important question is whether a chromatin assembly complex exists for CENP-A, as is the case for other histone H3 variants (Tagami et al., 2004). Histone H3.1, also known as “canonical” histone H3, is deposited throughout chromatin by chromatin assembly factor 1 (CAF-1) complex during DNA replication. At some locations (i.e., active promoters) H3.1 is replaced by H3.3 by a complex containing the histone regulator A (HIRA) protein in a process uncoupled from DNA replication (De Koning et al., 2007; Elsaesser et al., 2010). Two major strategies have been used to identify factors involved in CENP-A incorporation: functional screens in fission yeast, worms, and flies, and biochemical purification of CENP-A-associated proteins in human cells (Hayashi et al., 2004; Obuse et al., 2004; Foltz et al., 2006; Izuta et al., 2006; Okada et al., 2006; Erhardt et al., 2008). Among the factors found in yeast and human cells are Mis18 and Scm3/HJURP (Holliday junction-recognizing protein). Mis18 is present at centromeres at the time of CENP-A incorporation, and some evidences suggest that it could prime centromeric chromatin by modulating its acetylation status (Hayashi et al., 2004; Fujita et al., 2007). Scm3 interacts with CENP-A and facilitates its deposition in budding and fission yeast (Camahort et al., 2007, 2009; Mizuguchi et al., 2007; Stoler et al., 2007; Pidoux et al., 2009; Williams et al., 2009). HJURP, a human protein functionally related to Scm3, associates with predeposited CENP-A, localizes to centromeres in early G1, and is required for CENP-A loading and maintenance (Dunleavy et al., 2009; Foltz et al., 2009; Shuaib et al., 2010). These results strongly suggest that HJURP is a bona fide CENP-A deposition factor. Members of this family of proteins have not been identified in *Drosophila* or *Caenorhabditis elegans*, however, implying the existence of alternative pathways for CENP-A assembly (Erhardt et al., 2008; Sánchez-Pulido et al., 2009). Furthermore, the mechanism of action of HJURP and its functional relationship with factors that interact with CENP-A and regulate its deposition in coordination with other major cell cycle events remains to be elucidated.

What directs HJURP to centromeres is also unknown. It is conceivable that centromeric chromatin containing CENP-A and canonical H3 nucleosomes (Blower et al., 2002) adopts a unique three-dimensional structure important not only for kinetochore assembly, but also to be recognized by the CENP-A loading machinery (Bloom, 2007). Factors like condensin, a protein complex that mediates chromosome condensation in mitosis, could contribute to such higher order organization of centromeric chromatin (Bernad et al., 2009). Indeed, previous studies have reported an abnormal morphology of centromeric chromatin and/or kinetochores in mitosis in the absence of condensin in a number of model organisms (Hagstrom et al., 2002; Wignall et al., 2003; Ono et al., 2004; Jäger et al., 2005; Oliveira et al., 2005), and condensin mutants in budding yeast show some loss of CENP-A/Cse4 from centromeres (Yong-Gonzalez et al., 2007). More recently, a defect in de novo loading of CENP-A has been observed after depletion of condensin in HeLa cells by siRNA (Samoshkin et al., 2009). This study does not

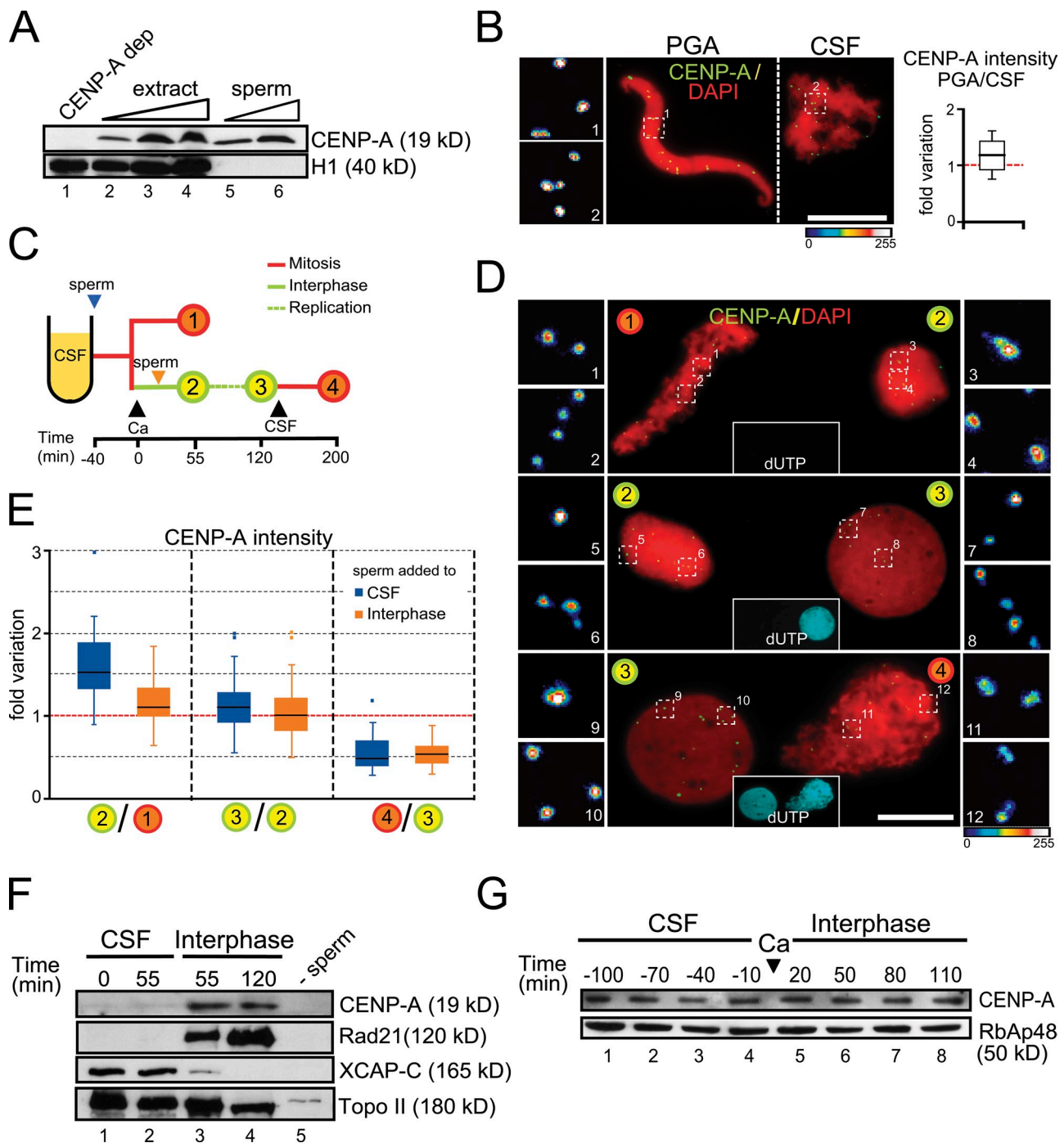
distinguish between the effects of condensin I and condensin II, the two distinct condensin complexes that exist in vertebrates. These complexes share the SMC2/CAP-E and SMC4/CAP-C core subunits but differ in the specific set of regulatory subunits: CAP-D2, -G, and -H in condensin I and CAP-G2, -D3, and -H2 in condensin II (Hirano, 2005). In somatic cells, condensin I and II are equally abundant. In contrast, condensin I is fivefold more abundant than condensin II in *Xenopus* egg extracts, and has a predominant role in chromosome condensation (Ono et al., 2003). Intriguingly, condensin II is enriched at centromeres and could therefore have a specific function at this region (Ono et al., 2004).

A robust in vitro system that could recapitulate CENP-A deposition would be an invaluable tool to dissect the requirements of this process in molecular detail. *Xenopus* egg extracts have proved to be a suitable system for the study of chromatin assembly and to delineate the functions of H3.1 and H3.3 complexes (Quivy et al., 2001; Ray-Gallet et al., 2002). Thus, we set out to develop a quantitative immunofluorescence-based assay to measure CENP-A incorporation in chromosomes assembled in *Xenopus* egg cell-free extracts. In this experimental system, one can analyze the effect of depleting a factor on a single round of CENP-A loading without accumulation of errors from previous rounds or alteration of cell cycle progression. The latter is especially important given that incorporation of CENP-A appears to be limited to a restricted period of the cell cycle, and thus knocking down a factor that affects cell cycle progression may indirectly affect CENP-A incorporation as well. Finally, the depletion can be rescued by adding back purified proteins or undepleted extract at different times in the course of the assembly reaction. Here we show that the spatial and temporal specificity of CENP-A deposition can be recapitulated on chromosomes assembled in the egg extracts. This reaction requires a functional homologue of HJURP that is present in the extract forming a complex with CENP-A. In addition, we have identified a requirement of condensin II, but no condensin I, for efficient assembly of CENP-A nucleosomes.

## Results

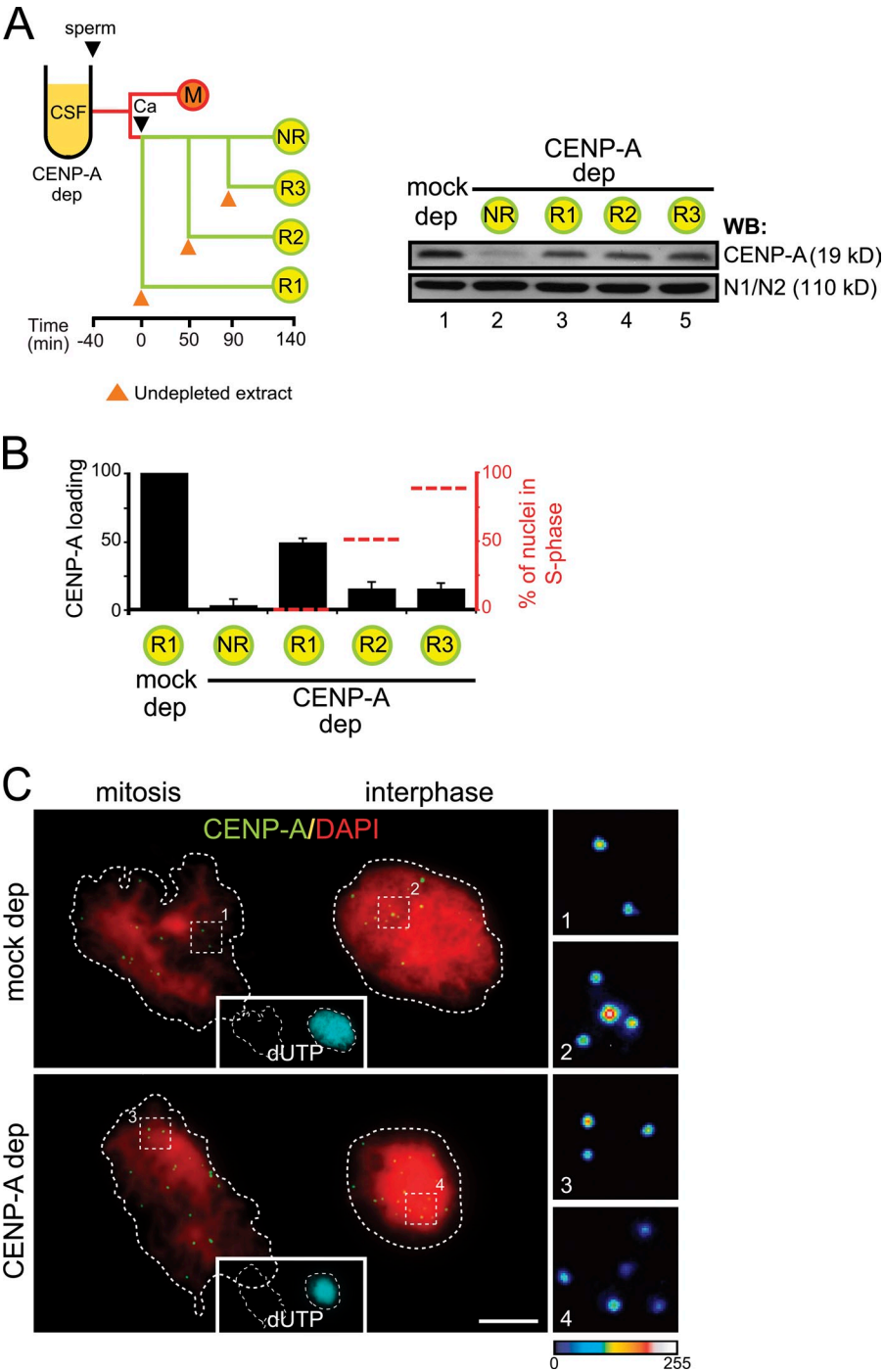
### Loading of CENP-A occurs upon exit from mitosis in *Xenopus* egg extracts

*Xenopus* egg extracts can recapitulate many cell cycle-specific chromosomal events after addition of demembrated sperm nuclei. These nuclei contain CENP-A that can be detected by immunoblot (Fig. 1 A) and visualized by immunofluorescence upon decondensation of the sperm by incubation with polyglutamic acid (PGA) or in egg extract (Fig. 1 B). The CENP-A antibody detects 10–20 foci per nucleus, consistent with the haploid number of chromosomes in *X. laevis*, which is 18. These foci colocalize with other centromeric proteins like CENP-T or Bub1, further supporting that they correspond to centromeres and little CENP-A labeling is observed outside them (Fig. S1 A; Rivera and Losada, 2009). Moreover, in vitro-translated myc-CENP-A added to the extract also incorporates to the centromeres labeled by CENP-T, albeit rather inefficiently (Fig. S1 B). For this reason, we decided to assess CENP-A loading by



**Figure 1. CENP-A deposition occurs in early interphase in *Xenopus* egg extracts.** (A) Sperm nuclei contain CENP-A. Immunoblot analysis of increasing amounts of egg extract (1, 2, and 3  $\mu$ l; lanes 2–4),  $3 \times 10^5$  and  $6 \times 10^5$  sperm nuclei (lanes 5 and 6), and 1  $\mu$ l of an extract depleted of CENP-A as control (lane 1). Unlike CENP-A, histone H1 is present in the soluble extract but not in the sperm nuclei. (B) Sperm nuclei were incubated with a buffer containing polyglutamic acid (PGA) or in CSF extract, mixed, centrifuged on the same coverslip, stained with anti-CENP-A (green) and DAPI (red), and imaged together. One representative pair of nuclei is shown. Bar, 10  $\mu$ m. In the blown-up images on the left the intensity of the CENP-A labeling has been coded with a color gradient going from blue (minimum) to white (maximum). The intensity of CENP-A signals was measured for 15 pairs of nuclei and plotted as fold variation of the average signal for each pair. (C) Outline of the chromatin assembly experiment and the time points at which samples were taken for analysis. The time of calcium addition is considered  $t = 0$ . Black arrowheads indicate additions to the extract. The blue and orange arrowheads indicate the time of sperm addition in the two different experiments described in the main text. (D) Representative images of pairs of nuclei from two consecutive time points of the assembly reaction processed and analyzed together. Nuclei were stained with CENP-A (green) and DAPI (red). Replication was visualized by incorporation of biotin-dUTP (cyan, insets in the center). Bar, 10  $\mu$ m. (E) Graph showing the fold variation of CENP-A signal intensities between two given time points (indicated by the numbers as in panel C) for two different time course experiments: blue boxes for the experiment in which sperm is added to CSF extract and orange boxes for addition of sperm in interphase extract. Data for each time point come from 15 pairs of nuclei in at least two independent experiments. (F) Immunoblot analysis of chromatin fractions obtained after incubation of sperm nuclei in CSF extract (lanes 1 and 2) or incubated in CSF for 40 min and then driven in interphase by addition of calcium (lanes 3 and 4). The times indicated correspond to the scheme in panel C. A mock assembly reaction without sperm DNA is shown as control (lane 5). (G) Immunoblot analysis of samples taken from an egg extract at the indicated times. The time of calcium addition is considered  $t = 0$ . The histone chaperone RbAp48 is shown as loading control.

**Figure 2. A window of opportunity for CENP-A loading in early interphase.** (A) Outline of the chromatin assembly experiment (left) and immunoblot analysis of total extracts to show soluble CENP-A levels under the indicated conditions (right). The histone binding protein N1/N2 is shown as loading control. Sperm was added at  $t = 0$  to CSF extracts (mock depleted or CENP-A depleted). For the mock-depleted extract, one-half volume of undepleted interphase extract was added at the time of calcium addition. For the CENP-A-depleted extract, either no extract was added back (no rescue [NR] condition) or one-half volume of undepleted interphase extract was added at the times indicated (R1, R2, and R3). (B) Bar graph showing the CENP-A loading efficiency under the conditions explained above, with respect to the mock-depleted extract. A small sample of the assembly mixture was taken right before addition of undepleted extract to check the percentage of nuclei showing some incorporation of biotin-dUTP (i.e., undergoing replication, red dotted line) at the time of restoring CENP-A availability, although analysis of CENP-A incorporation was performed comparing CENP-A signals from fully replicated interphase nuclei (taken at  $t = 140$  min) and mitotic chromosomes from images such as those shown in C. At least 15 pairs of nuclei were measured for each condition. Bars represent mean  $\pm$  SE. (C) Representative images of a mass of mitotic chromosomes next to a replicated interphase nuclei stained with anti-CENP-A (green) and DAPI (red) taken from the mock-depleted (top) and CENP-A-depleted (bottom) samples. Replication was visualized by incorporation of biotin-dUTP (cyan). Bar, 10  $\mu$ m.



measuring the change in the fluorescent signal of CENP-A at individual centromeres. Nuclei in two different time points of an assembly reaction, or under two different conditions, were spun over the same coverslip, and then processed for immunofluorescence and imaged together. On these images, we quantified the intensity of CENP-A signals and calculated the average increase in CENP-A staining for each pair of nuclei (see Materials and methods for details). We first noticed that the ratio of CENP-A content between the PGA-treated nuclei and the mitotic chromosomes assembled in cytosolic factor (CSF) extract (i.e., prepared from eggs arrested in meiosis II) was  $1.2 \pm 0.1$  (Fig. 1 B, graph). Thus, no incorporation of CENP-A occurred

during incubation in this CSF extract. However, 55 min after adding calcium to the CSF assembly mixture to drive degradation of cyclin B and entry into interphase (sample labeled “2” in Fig. 1, C–E), a clear increase of CENP-A could be observed with respect to the signal detected in mitotic chromosomes (sample labeled “1” in Fig. 1, C–E; blue box on the left in the graph in Fig. 1 E). Further incubation in interphase allowed DNA replication to be completed (as indicated by incorporation of a biotinylated nucleotide; insets in Fig. 1 D), but the increase in CENP-A labeling was minor during this period (sample labeled “3” in Fig. 1, C–E; blue box on the middle in Fig. 1 E). These results were confirmed by Western blot analysis of chromatin fractions.

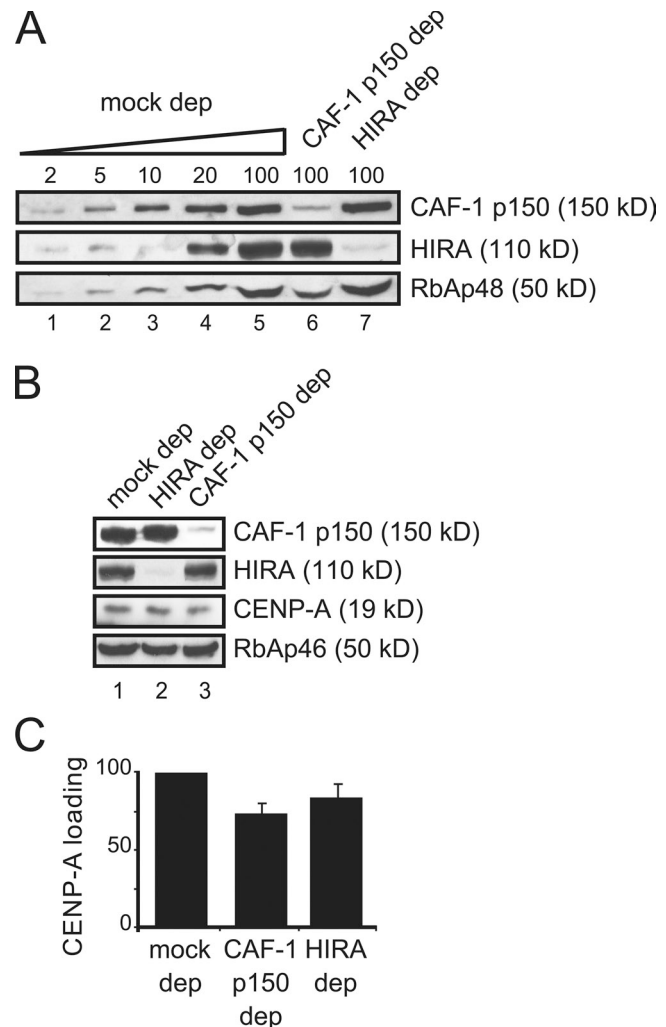


The amount of CENP-A present on chromatin after incubation of the sperm in a CSF extract was probably under a detection threshold (Fig. 1 F, lanes 1 and 2), but became visible 55 min after addition of calcium to a sample incubated in CSF for 40 min, and did not increase further (Fig. 1 F, lanes 3 and 4). There is no variation in the levels of soluble CENP-A present in the extract during this assembly reaction (Fig. 1 G). When the nuclei were driven back to mitosis by addition of CSF extract, thereby turning into condensed chromosomes with paired sister chromatids, the intensity of CENP-A labeling was reduced almost twofold due to the resolution of sister centromeres (i.e., each single dot in an interphase nuclei was split into two; sample labeled “4” in Fig. 1, C–E; blue box on the right in Fig. 1 E). Thus, incorporation of CENP-A into sperm chromatin occurs in early interphase and is uncoupled from bulk DNA replication. In fact, the intensity of CENP-A signals in late interphase nuclei assembled in the presence or absence of the DNA replication inhibitor aphidicolin is identical, again indicating that DNA replication is not required for CENP-A loading (Fig. S1 C).

In the time course experiments described in the previous paragraph, centromeres do not get to assemble a full complement of CENP-A. However, if we directly compared the amount of CENP-A between mitotic chromosomes assembled in CSF and late interphase nuclei from the same assembly reaction (corresponding to time points 1 and 3, respectively, in Fig. 1 C), the numbers that we obtained were closer to a two-fold increase ( $1.9 \pm 0.1$ ,  $n = 24$  experiments). We also checked CENP-A assembly after exit from the second mitosis, and found similar loading efficiency (not depicted). Henceforth, we performed CENP-A loading assays under different depletion conditions by comparing a late interphase sample and a mitotic sample.

#### A window of opportunity for CENP-A loading in early interphase

When a CSF extract is first treated with calcium and sperm chromatin is added after 40 min, i.e., once cyclin B has been degraded and the extract is in interphase, incorporation of CENP-A is clearly reduced (Fig. 1 E, orange boxes). This result suggests that previous passage of centromeric chromatin through mitosis could be important for efficient CENP-A incorporation. Alternatively, a factor required for CENP-A loading may be present or exert its function on centromeric chromatin only in early G1. We next asked whether CENP-A can be loaded on chromatin at any time during interphase. For this, we performed the CENP-A loading assay in extracts depleted of CENP-A to which one half volume of undepleted extract was added at different times in interphase (R1, R2, or R3; R is for “rescue”) or not added (NR [no rescue]; Fig. 2 A). As expected, when there is no CENP-A in the extract the loading efficiency relative to a mock-depleted extract is less than 5% (Fig. 2 B, NR condition; and Fig. 2 C). This result validates the assay and indicates that the observed increase in CENP-A staining reflects loading of new CENP-A and is not due to enhanced accessibility of the antibody to centromeres in interphase. Addition of undepleted extract to the CENP-A-depleted extract can partially restore CENP-A loading when added at the same time as calcium (Fig. 2, A and B; 49%

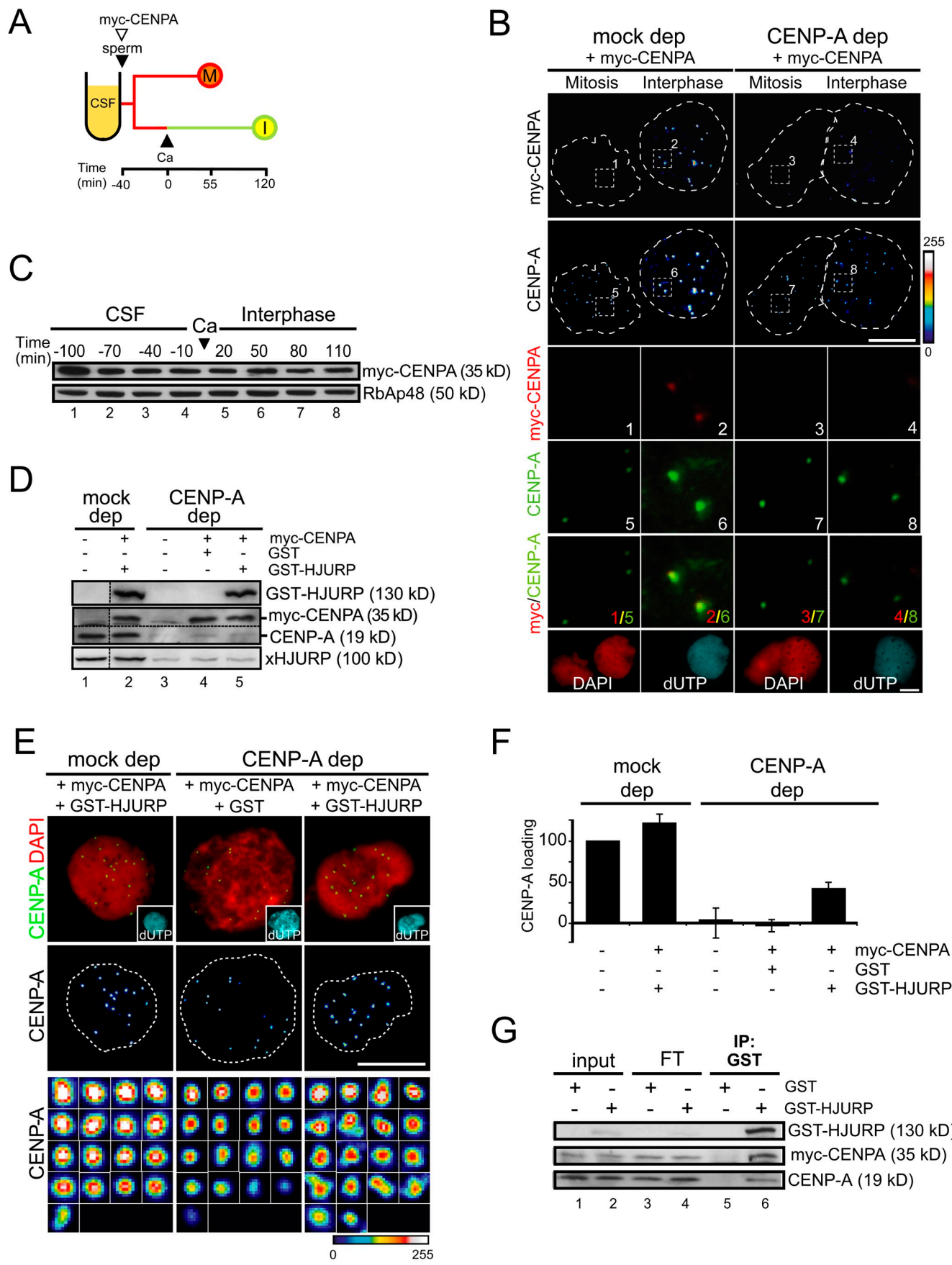


**Figure 3. CENP-A incorporation in CAF-1 p150- and HIRA-depleted extracts.** (A) Immunoblot analysis of increasing amounts of a mock-depleted extract (expressed as percentage of a 1.5- $\mu$ l aliquot) and 1.5- $\mu$ l aliquots of CAF-1 p150- and HIRA-depleted extracts with the indicated antibodies. RbAp48 levels are also shown. (B) Immunoblot analysis of aliquots from a mock-depleted extract, HIRA- and CAF-1 p150-depleted extracts to show the remaining levels of CENP-A. RbAp46 levels are also shown. (C) Bar graph showing the CENP-A loading efficiency in the depleted extracts with respect to the mock. Bars represent mean  $\pm$  SE from two independent experiments.

efficiency of CENP-A loading in R1 condition). However, if CENP-A availability is restored 50 min and 90 min post-calcium (Fig. 2, A and B; R2 and R3, respectively), when replication is underway in 50% (R2) and 90% (R3) of the nuclei, the efficiency of CENP-A loading drops to 15%. Thus, CENP-A incorporation appears to be restricted to early interphase, before DNA replication starts.

#### CAF-1 and HIRA are not major CENP-A loaders

We next tested whether the H3.1 and H3.3 deposition complexes have any role in the deposition of CENP-A. Antibodies against the CAF-1 p150 subunit and HIRA were able to immunodeplete more than 95% of the corresponding protein (Fig. 3 A) without affecting the levels of soluble CENP-A (Fig. 3 B).



We then measured the increase in CENP-A staining between interphase nuclei and mitotic chromosomes assembled under each condition (Fig. 3 C). A small decrease in the efficiency of CENP-A loading was observed in the CAF-1–depleted extracts ( $73 \pm 6\%$ ) and in the HIRA–depleted extracts ( $84 \pm 9\%$ ). We noticed that depletion of CAF-1 p150 also decreases the levels of RbAp48 (Fig. 3 A), but not the levels of RbAp46 (Fig. 3 B), histone chaperones present in both H3.1 and H3.3 deposition complexes. Experiments in vitro with purified histones and recombinant CENP-A and RbAp48 showed incorporation of CENP-A nucleosomes on plasmid DNA, prompting the hypothesis that CENP-A could be loaded on chromatin by a passive mechanism involving this chaperone (Furuyama et al., 2006). Also, human cells with reduced levels of RbAp46/48 show defects in CENP-A loading (Hayashi et al., 2004; Dunleavy et al., 2009). Thus, it was possible that the observed decrease in CENP-A loading efficiency upon CAF-1 p150 depletion could be due to co-depletion of RbAp48. However, when we performed the CENP-A incorporation assay after immunodepletion of RbAp48 with a specific antibody, CENP-A loading was not affected (unpublished data). We conclude that neither CAF-1 p150 nor HIRA are the major loaders of CENP-A in *Xenopus* egg extracts.

#### Human HJURP promotes CENP-A deposition in *Xenopus* egg extracts

To rescue CENP-A loading, in vitro–translated myc–CENP-A was added to CENP-A–depleted CSF extracts (and mock-depleted extracts as control) along with sperm DNA. After 40 min each mixture was divided in two, calcium was added to one tube, and incubation proceeded for additional 120 min (Fig. 4 A). Only the interphase nuclei from the mock-depleted extract showed centromere-specific myc staining (Fig. 4 B, left panels). This result confirms that incorporation of CENP-A does not take place in CSF but in subsequent interphase and also indicates that the exogenous protein is functional. However, myc–CENP-A does not go to chromatin in the CENP-A–depleted extract (Fig. 4 B, right panels) despite being stable in the extract (Fig. 4 C), and is present at levels similar to endogenous CENP-A (Fig. 4 D, lane 2). We reasoned that depletion of CENP-A might co-deplete an essential component of the loading machinery. Given the recent identification of HJURP as a CENP-A–specific chaperone in human cells (Dunleavy et al., 2009; Foltz et al., 2009), we next tested whether addition of this protein along with myc–CENP-A

to a CENP-A–depleted extract could restore CENP-A loading. Indeed, addition of recombinant human HJURP (GST–HJURP), but not GST, allowed CENP-A incorporation (Fig. 4, E and F). Quantification of the increase in CENP-A staining with respect to a mock-depleted extract showed a recovery of 42% in CENP-A loading in the presence of GST–HJURP, but no recovery at all when GST was added instead (Fig. 4 F). Consistent with these results, GST–HJURP was found to coimmunoprecipitate with myc–CENP-A and endogenous CENP-A (Fig. 4 G). Thus, it is likely that a homologue of human HJURP exists in the egg extract and is essential for CENP-A loading.

#### xHJURP is stored in a complex with CENP-A

A homology database search has recently proposed the existence of an HJURP protein in *Xenopus tropicalis* (Sánchez-Pulido et al., 2009). A full-length cDNA encoding this protein is not yet available. Maybe not surprisingly given the low sequence conservation between human HJURP (hHJURP) and its putative counterpart in *Xenopus*, antibodies against the former do not recognize any protein in the immunoprecipitates of CENP-A from egg extracts. We therefore raised new antibodies against a fragment of the putative *Xenopus* HJURP (xHJURP) and found that they recognize and immunoprecipitate a 100-kD protein (Fig. S2, A and B). CENP-A is present in these immunoprecipitates (Fig. S2 B). Using these antibodies, we confirmed that CENP-A depletion also removes xHJURP from the extract (Fig. 4 D, bottom), thereby explaining why addition of myc–CENP-A alone cannot rescue CENP-A loading in a CENP-A–depleted extract. The levels of other histone chaperones are not affected by the depletion of CENP-A (Fig. S2 C).

#### xHJURP is essential for CENP-A deposition and localizes to centromeres

When xHJURP is removed from the extract, CENP-A levels are reduced to 20–50% and loading is abolished (Fig. 5 A). Even if myc–CENP-A is added to the xHJURP–depleted extract to reconstitute CENP-A levels, loading is impaired (Fig. 5 B, lane 5; and Fig. 5 C, fourth bar from the left). Again, we confirmed that myc–CENP-A is stable in the xHJURP–depleted extract throughout the duration of the experiment (Fig. 5 B). Only when hHJURP (GST–HJURP) is also added is loading partially restored (Fig. 5 B, lane 6; and Fig. 5 C, last bar). Thus, the role of HJURP in deposition of the centromeric histone is conserved in *Xenopus* egg extracts.

**Figure 4. Human HJURP promotes loading of *Xenopus* CENP-A.** (A) Outline of the chromatin assembly experiment. Mitotic chromosomes (M) and interphase nuclei (I) were assembled in mock- and CENP-A–depleted extracts containing in vitro–translated (IVT) myc–CENP-A. (B) Nuclei and chromosomes were stained with antibodies against myc (top) and CENP-A (second from top), both color coded with a gradient as in Fig. 1 B. Insets 1–4 show that myc signals (red) overlap with CENP-A signals (green) in interphase nuclei of mock-depleted extracts (inset 2 and 6), whereas weak myc signals in CENP-A–depleted interphase nuclei (inset 4) are mostly background. DAPI staining (red) and biotin–dUTP (cyan) are shown in the bottom row. Bar, 10  $\mu$ m. (C) IVT myc–CENP-A was added to a CENP-A–depleted extract along with sperm DNA and samples of the reaction were taken at the indicated times and analyzed by immunoblot with anti-myc and anti-RbAp48 as loading control. The time of calcium addition is considered  $t = 0$ . Cell cycle progression was monitored by chromosome morphology after DAPI staining (not depicted). (D) Immunoblot analysis of the extracts used for chromatin assembly in panel E. Antibodies against human and *Xenopus* HJURP were used to detect GST–HJURP (top) and endogenous xHJURP (bottom), respectively, whereas anti-CENP-A was used to simultaneously detect myc–CENP-A and endogenous CENP-A (middle). (E) Representative images of interphase nuclei from the indicated extracts stained with anti-CENP-A (green) and DAPI (red). Insets in the images of the first row show biotin–dUTP incorporation (cyan). In the images from the middle and bottom rows, CENP-A labeling has been color coded as in Fig. 1 B. In the bottom row, all centromeres from the nuclei presented above are shown at higher magnification. Bar, 10  $\mu$ m. (F) Graph showing the loading efficiency of CENP-A in the indicated extracts compared with a mock-depleted extract. Bars represent mean  $\pm$  SE from two independent experiments. (G) GST–HJURP interacts with myc–CENP-A and endogenous CENP-A. Analysis of an immunoprecipitation reaction with anti-GST from an egg extract containing myc–CENP-A and either GST alone or GST–HJURP. Aliquots (1.5%) from input and flow-through (FT) fractions were also analyzed.

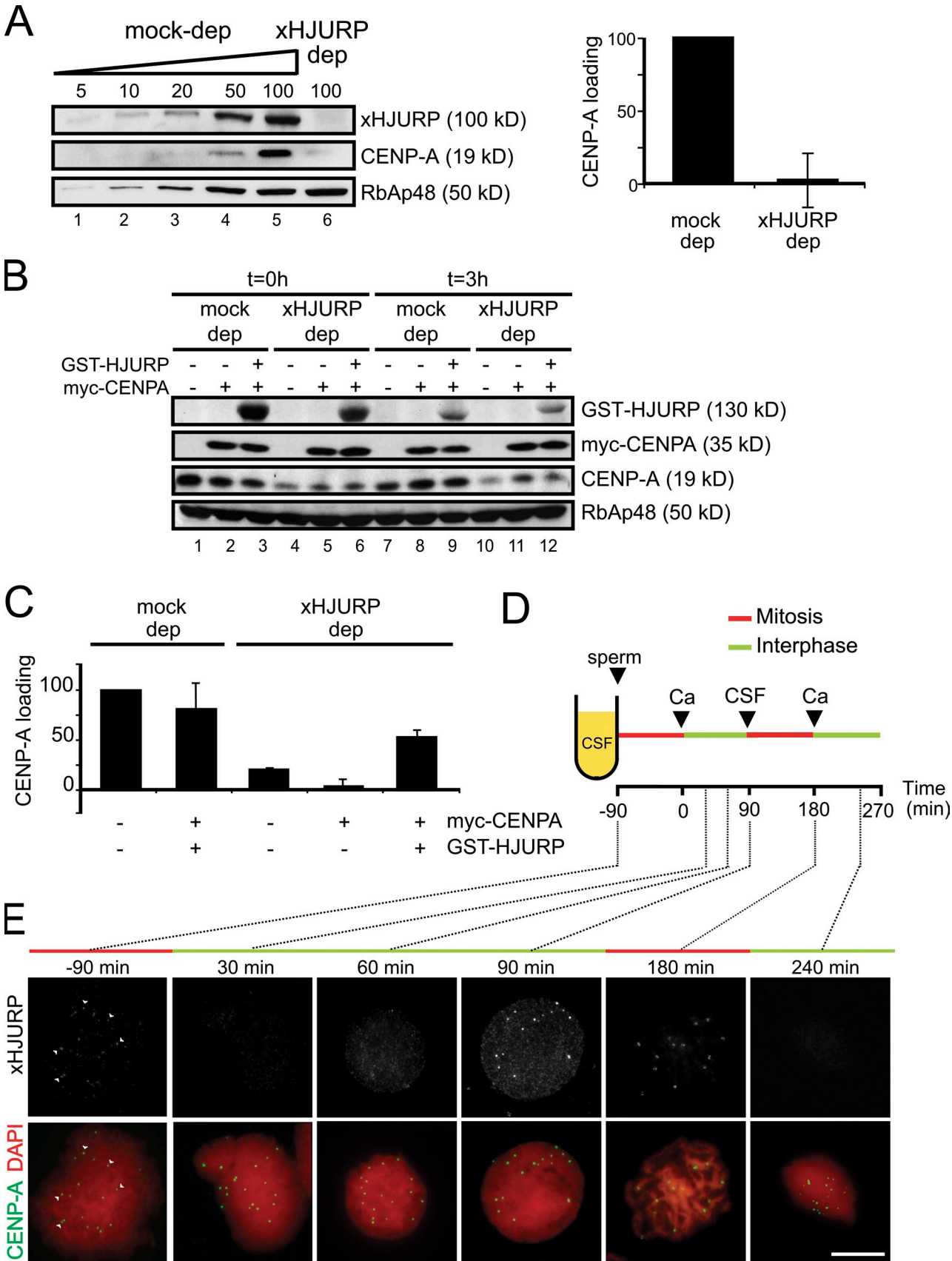


Figure 5. **xHJURP is required for CENP-A deposition.** (A) Left, immunoblot analysis of increasing amounts of a mock-depleted extract (5–100% of a 1.5- $\mu$ l aliquot, lanes 1–5) and a 1.5- $\mu$ l aliquot of an xHJURP-depleted extract (lane 6). Right, graph showing the loading efficiency of CENP-A in an extract depleted of xHJURP. Data come from two different experiments. Bars represent mean  $\pm$  SE. (B) Immunoblot analysis of mock-depleted and xHJURP-depleted



In human cells, HJURP localizes transiently to centromeres in late telophase/early G1 whereas fission yeast Scm3 remains at centromeres throughout the cell cycle except from prophase to telophase. We performed a time course to examine xHJURP localization in egg extracts (Fig. 5 D). Weak xHJURP staining could be detected at some centromeres on mitotic chromosomes assembled in CSF (Fig. 5 E, white arrowheads in –90-min sample). The signal was lost upon calcium addition (30-min sample). A diffuse staining all over chromatin was observed by 60 min, but 30 min later xHJURP was enriched at all centromeres and stayed there when CSF was added to promote entry in mitosis (180-min sample). Again, calcium addition led to delocalization of xHJURP from centromeres (240-min sample). These observations suggest that HJURP is not an integral part of the centromere, raising the possibility that it acts enzymatically. Supporting this possibility, restoring HJURP levels to 25% of normal levels by adding one-third volume of undepleted extract to an HJURP-depleted extract fully restores CENP-A loading (Fig. S3).

### Condensin II prevents CENP-A eviction

We next investigated whether condensin contributes to CENP-A assembly. As mentioned before, there are two distinct condensin complexes in *Xenopus* egg extracts that can be depleted separately or simultaneously without affecting CENP-A levels in the soluble extracts (Fig. 6 A). Targeting of each complex to chromatin are independent events, and in particular, centromeric enrichment of condensin II does not require condensin I (Fig. S4). Quantitation of the CENP-A signals present in mitotic chromosomes assembled in CSF extracts depleted of both condensins with respect to control samples revealed a significant reduction in the amount of CENP-A (Fig. 6, B and C). Because there is no loading of CENP-A during mitosis, this result implies that CENP-A present in the sperm chromatin added to the extract is being lost or evicted. Removal of condensin II is largely responsible for this effect, although condensin I may also contribute (Fig. 6 C). Depletion of CENP-A or depletion of xHJURP does not lead to eviction. Unlike CENP-A nucleosomes, the stability of H3 nucleosomes is not altered by the absence of condensin II, at least as judged by immunoblot analysis of chromatin fractions (Fig. 6 D).

To check whether the lack of condensin also results in eviction of CENP-A in interphase, we compared the CENP-A signals in nuclei assembled by adding sperm to an interphase extract, without previous incubation in CSF. As shown in Fig. 1 E (orange squares), the nuclei assembled under this condition load little maternal CENP-A. We observed a reduction in CENP-A signal intensities in the absence of condensin II (Fig. S5). Together, these results indicate that condensin II contributes to retention of CENP-A nucleosomes already present in centromeric chromatin, both in mitosis and interphase.

### Condensin II is required for proper loading of CENP-A

We next assayed CENP-A loading in the absence of each condensin complex. Nuclei assembled in extracts depleted of condensin I loaded CENP-A almost as well as those present in mock-depleted extracts. In contrast, depletion of condensin II alone or double depletion of both condensin I and II led to negative CENP-A loading values suggesting that, in addition to the eviction problem described in the previous paragraph, de novo loading of CENP-A was severely impaired (Fig. 7 A). Immunodepletion of condensin II was performed with an antibody against XCAP-D3, whereas an antibody against XCAP-E was used to immunodeplete both condensins simultaneously. Because the same defect in CENP-A loading is observed using two distinct antibodies, it is unlikely that it is due to unspecific removal of a factor other than condensin II. Nevertheless, to further test the specificity of the defect, affinity-purified condensin II was added back to a condensin II-depleted extract. We found that restoration of the condensin II level to around 30% of the level in a mock-depleted extract (Fig. 7 B, lane 7) led to partial recovery of CENP-A loading (23%, Fig. 7 C). We conclude that condensin II is specifically required for proper CENP-A nucleosome assembly into centromeres.

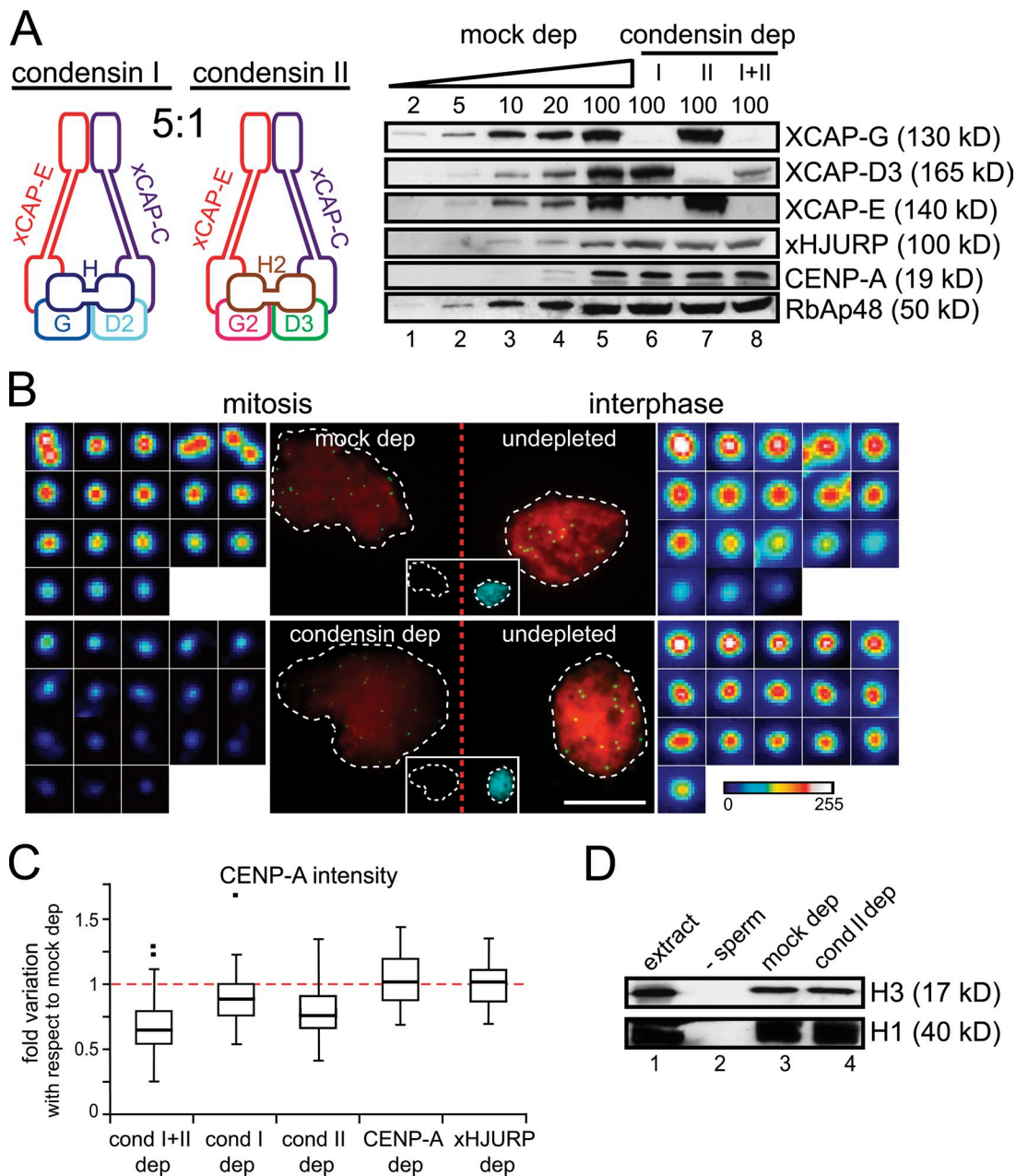
Depletion of condensin II did not affect the levels of xHJURP in the soluble extract (Fig. 6 A). xHJURP targeting to centromeres, best observed by late interphase and in subsequent mitosis, was also normal (Fig. 7 D). Thus, the defect in CENP-A loading is not due to HJURP being unable to recognize the centromere region in the absence of condensin II.

## Discussion

The mechanism of centromere specification and propagation has remained elusive for decades. The realization that CENP-A is the major marker of this locus has led to the identification of a number of factors that play a role in the deposition of the centromeric histone (Allshire and Karpen, 2008; Bernad et al., 2009; Torras-Llort et al., 2009). Despite major advances, a molecular understanding of this process and its cell cycle regulation is still lacking. To tackle this issue we have developed an immunofluorescence-based assay that measures CENP-A incorporation at centromeres of chromosomes assembled in the *Xenopus* egg cell-free system. Using this assay, we demonstrate that CENP-A assembly occurs in early interphase and is uncoupled from DNA replication. The H3.1 and H3.3 deposition complexes containing p150 CAF-1 and HIRA, respectively, previously shown to be critical for efficient assembly of their respective nucleosomes in *Xenopus* egg extracts, are not major loaders of the centromeric histone variant in this system (Quivy et al., 2001; Ray-Gallet et al., 2002; Tagami et al., 2004).

extracts replenished or not with myc-CENP-A and GST-HJURP at the time of sperm addition ( $t = 0$ , lanes 1–6) and at the end of the experiment ( $t = 3$  h, lanes 7–12). (C) Loading efficiency of CENP-A in the indicated extracts. Data come from two independent experiments. Bars represent mean  $\pm$  SE. (D) Outline of the chromatin assembly reaction used to assess the localization of xHJURP throughout the cell cycle reproduced in the extract by successive additions of calcium and CSF extract. Sperm chromatin (800/ $\mu$ l) was added at time 0. The times at which aliquots were taken for analysis are indicated. (E) Immunofluorescent staining with anti-xHJURP (green), CENP-A (red), and DAPI (blue). White arrowheads point to HJURP signals that colocalize with CENP-A signals on CSF assembled chromosomes. Bar, 10  $\mu$ m.

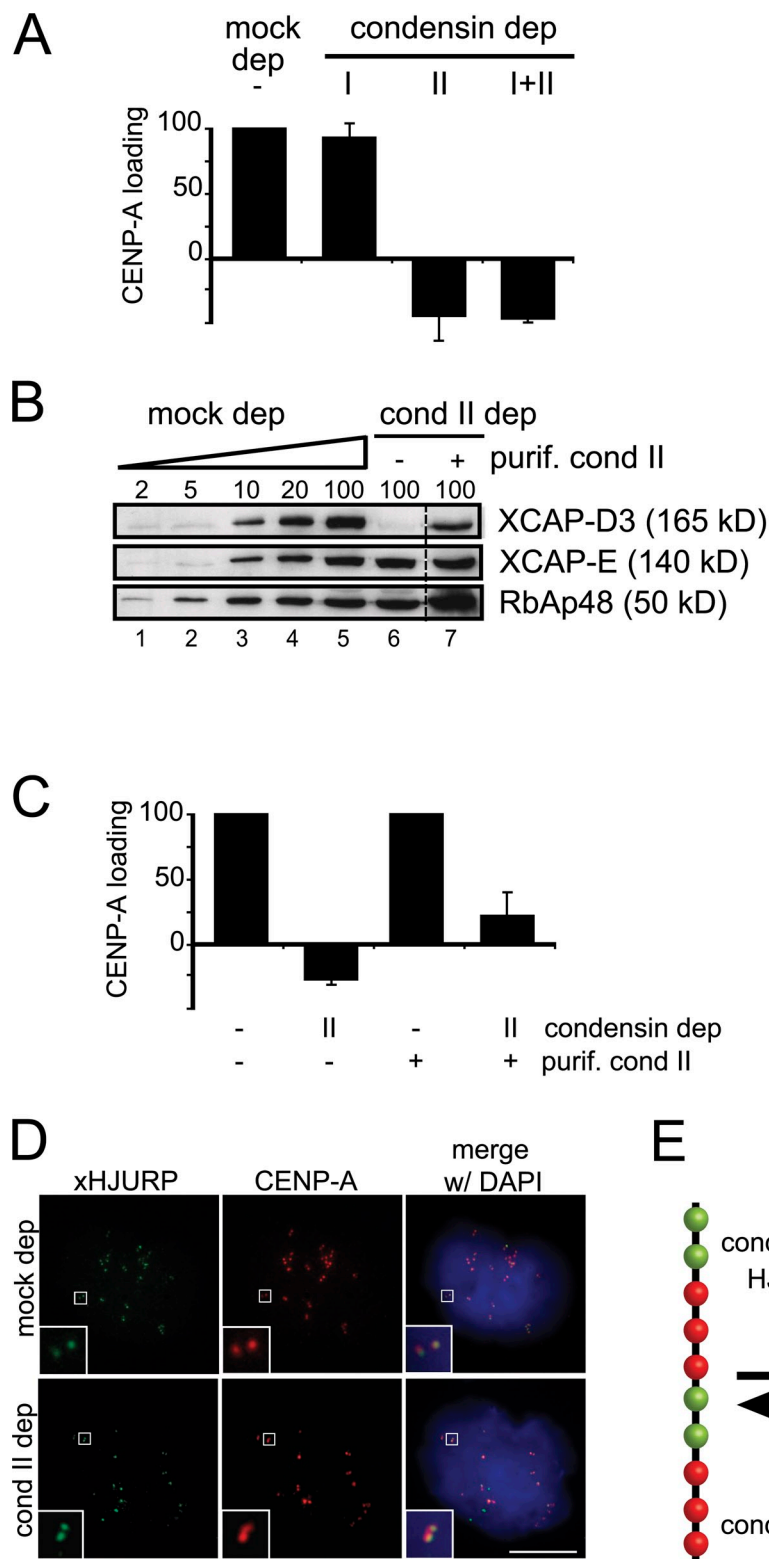




**Figure 6. Condensin II prevents eviction of CENP-A nucleosomes from centromeres.** (A) Left, subunit composition of the two condensin complexes. Right, immunoblot analysis of increasing amounts of a mock-depleted extract (expressed as percentage of a 1.5- $\mu$ l aliquot) and extracts depleted of condensin I, condensin II, or both with the indicated antibodies. RbAp48 is shown as loading control. (B) Sperm chromatin was added to mock-depleted (top) and condensin-depleted (bottom) CSF extracts and incubated for 90 min. To serve as reference, sperm chromatin was added to an undepleted CSF extract, incubated for 40 min, and then calcium was added and incubation continued for 90 min. The latter samples (replicated interphase nuclei, as evidenced by the incorporation of biotin dUTP) were mixed with the former ones (mitotic chromosomes), centrifuged over coverslips, and stained with anti-CENP-A (green), DAPI (red), and streptavidin (cyan). Representative images of the photographed pairs are shown, with corresponding blown-up images of each individual centromere. (C) CENP-A signals in chromosomes assembled in depleted CSF extracts were measured in comparison with a reference sample, as described in B. The resulting numbers are expressed and plotted as fold variation relative to the average value obtained for the mock-depleted extract, arbitrarily set to 1 (red dotted line). Data from at least two independent experiments are shown for the depletion of condensins and from a single experiment in the case of CENP-A and xHJURP depletions. (D) Immunoblot analysis of chromatin fractions from assembly reactions in mock- and condensin II-depleted extracts. An aliquot of extract (lane 1) and a chromatin fraction from a mock assembly reaction with no sperm (lane 2) were also analyzed.

Instead, we have found that more than half of the CENP-A in the egg extract is present in a complex with xHJURP, a member of the recently identified Scm3/HJURP family of proteins proposed to be CENP-A-specific chaperones from yeast to human (Camahort et al., 2007, 2009; Mizuguchi et al., 2007; Stoler et al., 2007; Dunleavy et al., 2009; Foltz et al., 2009; Pidoux et al., 2009;

Sánchez-Pulido et al., 2009; Williams et al., 2009; Shuaib et al., 2010). Exogenously added CENP-A competes poorly with endogenous CENP-A for the binding to HJURP, which explains why myc-CENP-A incorporates into centromeres rather inefficiently and is not useful to measure CENP-A loading (Fig. S1 B; unpublished data). Remarkably, we found that hHJURP is able to



**Figure 7. Condensin II is required for efficient loading of CENP-A.** (A) Bar graph showing the CENP-A loading efficiency in the indicated extracts in two independent experiments. Bars represent mean  $\pm$  SE. (B) Immunoblot analysis of increasing amounts of a mock-depleted extract (expressed as percentage of a 1.5- $\mu$ l aliquot, lanes 1–5) and an extract depleted with anti-XCAP-D3 without (lane 6) or with 1:10 volume of affinity-purified condensin II (lane 7). (C) Bar graph showing the CENP-A loading efficiency in mock- and condensin II-depleted extracts with and without adding back purified condensin II. (D) Immunofluorescent staining of mitotic chromosomes assembled in mock- and condensin II-depleted extracts with antibodies against xHJURP (green) and CENP-A (red). DNA was counterstained with DAPI (blue). Bar, 10  $\mu$ m. (E) Model to explain the role of xHJURP and condensin II in CENP-A dynamics. CENP-A and H3 nucleosomes are shown in green and red, respectively. Net incorporation of CENP-A will depend on the balance between addition of new CENP-A nucleosomes, a process in which xHJURP has a key role, and eviction of these nucleosomes. Condensin II prevents eviction of CENP-A nucleosomes but it is also required for their incorporation.

interact and load xCENP-A in an extract depleted of the endogenous xHJURP despite the little sequence conservation between human and frog HJURP. The region of human HJURP that binds to CENP-A has been recently mapped to the N-terminal domain (Shuaib et al., 2010), consistent with the identification within this region of a relatively conserved domain (the Scm3 domain) in all HJURP/Scm3-related proteins (Sánchez-Pulido

et al., 2009). Conversely, HJURP recognizes the CATD domain of CENP-A, and this domain is highly conserved among CENP-A proteins from different species. How CENP-A nucleosomes are actually assembled into chromatin remains to be elucidated. The action of remodeling complexes like FACT and RSF, identified in the CENP-A immunoprecipitates, could be required in concert with that of HJURP (Obuse et al., 2004; Foltz et al., 2006;

Okada et al., 2009; Perpelescu et al., 2009). In any case, our results not only support the evolutionary conservation of the CENP-A deposition process and its epigenetic nature, but further substantiate the key role of HJURP.

#### Timing issues in CENP-A assembly

In human cells, CENP-A levels are low in late G1-S and increase in G2-M, and this regulation likely contributes to the temporal and spatial specificity of CENP-A loading (Shelby et al., 1997, 2000). It has been proposed that one function of HJURP may be to protect CENP-A from degradation (Dunleavy et al., 2009). In yeast, proteolysis of Cse4 is also important to restrict Cse4/CENP-A localization (Collins et al., 2004). In contrast, CENP-A levels are constant during the chromatin assembly experiments described here. It is therefore possible that the CENP-A degradation machinery is not active in the embryonic cycles. Additional mechanisms must exist to prevent incorporation of CENP-A at noncentromeric regions. Remarkably, we observed that addition of undepleted extracts to a CENP-A-depleted extract restores loading only if added at the time of calcium addition. We speculate that efficient targeting or incorporation of CENP-A requires a post-translational modification of HJURP/CENP-A or of the centromeric chromatin that occurs in mitosis or early G1. Mis18 function could be involved in this priming. At least in human cells, its binding to centromeres appears to precede the binding of HJURP (Fujita et al., 2007; Foltz et al., 2009). Nuclear envelope formation or DNA replication may prevent loading of CENP-A at later time points in interphase.

#### The role of condensin II in CENP-A assembly

Our data show that condensin II is specifically required for proper CENP-A nucleosome dynamics (Fig. 7 E). It has been proposed that the easier disassembly of CENP-A nucleosomes compared with H3 nucleosomes could facilitate the clearance of those promiscuously incorporated into euchromatic regions (Moreno-Moreno et al., 2006; Conde e Silva et al., 2007) or deposited at sites of DNA damage (Zeitlin et al., 2009). In turn, this disassembly would have to be counterbalanced by some property of centromeric chromatin, and we speculate that this property is linked to the action of condensin II in this region both in mitosis and interphase. It will be of great interest to determine if other factors shown to be critical for CENP-A assembly may play a role in preventing eviction.

Condensin II likely contributes to the three-dimensional organization of the alternating blocks of CENP-A nucleosomes and H3 nucleosomes present in centromeric chromatin (Blower et al., 2002; Marshall et al., 2008; Santaguida and Musacchio, 2009). In turn, this organization dictates the assembly of the kinetochore and may also facilitate the targeting of the CENP-A assembly machinery (Silva and Jansen, 2009). CENP-C and proteins of the constitutive centromere-associated network (CCAN) bind this centromeric chromatin: CENP-T/CENP-W associate with H3 nucleosomes, whereas CENP-N and CENP-C interact with CENP-A (Hori et al., 2008; Carroll et al., 2009, 2010). CENP-C is absent from sperm DNA but assembles onto centromeres upon incubation in the CSF extract (Milks et al., 2009). Future studies will have to determine whether this is also

the case for other components of CCAN—not yet described in *Xenopus*—and how the targeting of these factors is affected by the absence of condensin II. We are currently developing antibodies toward some of these proteins. Although we found that HJURP can still target the centromeres in the absence of condensin II, we speculate that its action, or the action of other chromatin-remodeling factors acting downstream of HJURP to accomplish CENP-A incorporation, may be ineffective under this condition.

In summary, our results indicate that CENP-A deposition in the *Xenopus* egg extract in vitro system is subject to the same spatial and temporal restrictions that apply in human cells, and that the major players involved are highly conserved. We have demonstrated that xHJURP is necessary for the loading of CENP-A and have shown that condensin II affects CENP-A dynamics, most likely by promoting proper organization of centromeric chromatin both in mitosis and interphase. We are confident that this assay will be a very powerful tool to further understand the molecular mechanisms underlying the process of the specification and propagation of centromeric chromatin.

## Materials and methods

#### Antibodies

A fragment of recombinant *Xenopus* HJURP was amplified from IMAGE clone 5157296 with the primers 5'-CACCATGATTCTTCCCAACATAG-3' and 5'-TCAGTTTGCACTCCGGTGTG-3', cloned in pENTR/D-TOPO and transferred to pDEST-17 (Invitrogen) to produce a His-tagged polypeptide in *Escherichia coli* that was purified and injected in rabbits for antibody production. The embryonic form of histone H1, known as B4, was purified fused to GST from a pGEX plasmid and also injected into rabbits. The following peptides were coupled to KLH and used as antigens to produce rabbit polyclonal antibodies against: XCAP-E (CSKTERRNRMEVDK), XCAP-G (CEKTKKNSKLNEEAN), XCAP-D3 (CRQRISGKAPLKPSN), Asf1 (CVGSASEEYDQVLDLS), xCENP-T (NLLIERHLPMEYRRRC), N1/N2 (CSH-LVRKKRKTTEES), RbAp46 (CEPDIPASELEAQQGS), and RbAp48 (CEDTEG-GVDPEGQGS). Other antibodies used in this study were against *Xenopus* CENP-A (Rivera and Losada, 2009), Rad21 (Losada et al., 1998), CAF-1 p150 (Quivy et al., 2001), HIRA (Ray-Gallet et al., 2002), nucleoplasmin (PA3C5, a generous gift from S. Dilworth, Imperial College Faculty of Medicine, London, UK; [Dilworth et al., 1987]), human HJURP (Sigma-Aldrich), GST (CNIO Monoclonal Antibodies Unit), myc (a rabbit polyclonal antibody for Western blot and a mouse monoclonal [clone 9B11] for immunofluorescence, both from Cell Signaling Technology), and histone H3 (ab1791; Abcam). A fraction of the CENP-A antibody was labeled with DyLight 549 (DyLight Microscale Labeling kit; Thermo Fisher Scientific).

#### Preparation and use of *Xenopus* egg extracts

Cytostatic factor (CSF)-arrested low speed supernatants of *Xenopus* eggs were prepared in XBE2 buffer (10 mM K-Hepes, pH 7.7, 0.1 M KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, and 50 mM sucrose) and driven to interphase by addition of 100 µg/ml cycloheximide and 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>. Aphidicolin (Sigma-Aldrich) was used at 25 µg/ml and biotin-16-dUTP (Roche) at 10 µM. Chromosome assembly reactions containing 800 sperm nuclei/µl were processed for immunofluorescence as described previously (Rivera and Losada, 2009) and mounted using Mowiol. Isolation of chromatin fractions for immunoblot analysis for Fig. 6 D was performed as described previously (Rivera and Losada 2009). For Fig. 1 F the protocol was modified: 400 µl of assembly reactions containing 800 sperm nuclei/µl extract were used and two rounds of centrifugation on sucrose cushions were required to achieve purity. Immunoprecipitation reactions were performed on 10 µl of protein A agarose beads using 100 µl of extract and 2–5 µg of antibody.

#### Immunodepletion and add-back

Immunodepletions were performed using Affi-prep Protein A support (Bio-Rad Laboratories) as described previously (Losada et al., 1998). In brief, depletion of 100 µl of extract required one (CENP-A) or two (xHJURP, condensin) rounds of incubation with 50 µl of beads bound to 30 µg of antibody. Condensin I was depleted with anti-XCAP-G, condensin II with anti-XCAP-D3,



and both condensins together either with anti-XCAP-E. In the case of CAF-1 p150 and HIRA, 33 and 10  $\mu$ l of crude sera, respectively, were bound to 50  $\mu$ l of beads. Antibodies were cross-linked to the beads using dimethyl pimelimidate (Sigma-Aldrich). For add-back experiments, myc-CENPA was synthesized in vitro using the TNT Quick Coupled Transcription/Translation system (Promega) and diluted in the extract 1:10 to 1:20 so that myc-CENPA was one- to fivefold more concentrated than endogenous CENP-A (Fig. 5, lane 1). *X. laevis* CENP-A (IMAGE clone 6327326) was cloned into plasmid pCS+MT (kindly provided by D. Turner, University of Michigan, Ann Arbor, MI) to produce a protein with six copies of the myc tag in the N terminus. Recombinant human HJURP-GST was purified from *E. coli* and 0.3–0.4 ng/ $\mu$ l was added to the extracts along with myc-CENPA (Dunleavy et al., 2009). For affinity purification of condensin II, 90  $\mu$ g of anti-XCAP-D3 antibody cross-linked to protein A-magnetic beads was incubated with 1 ml of egg extract for 1 h. After extensive washing, the bound complex was eluted with 100  $\mu$ l of 1 mg/ml D3 peptide in XBE2 buffer for 1 h at room temperature, concentrated in a Centricon unit (Millipore), and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Two distinct XCAP-D3 antibodies raised against the same antigen were used for depletion of condensin II and for affinity purification of the complex.

### Image analysis for the CENP-A loading assay

Relative measurements of CENP-A content were obtained by processing and imaging together samples from consecutive time points in the assembly reaction. The sample from the first time point was kept on ice until required. In most cases, two 15- $\mu$ l aliquots of the assembly reactions [e.g., CSF-assembled chromosomes and interphase nuclei] were mixed, and immediately fixed and spun over the same coverslip. For imaging, chromatin states were elucidated by morphology (condensed chromosomes vs. interphase nuclei) and/or dUTP incorporation (replicated vs. nonreplicated nuclei). In most experiments, undepleted CSF-assembled chromosomes were used as standard reference. Images were taken using a microscope (model DM6000; Leica), with a HCX PlanApochromat 63 $\times$ /1.4 oil immersion objective. Quantification and processing were done with ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Images of CENP-A staining were set to binary using the Threshold tool, and then individual centromeres were selected as regions of interest (ROIs) applying the Analyze Particles function. When required, the Watershed function was used to separate centromeres in close vicinity. Alternatively, centromeric regions were selected manually using drawing tools. Using ROI Manager, ROI lists were created for individual nuclei. The average Integrated Density (ID = average pixel intensity  $\times$  area) was first calculated from the IDs of centromeres within each nucleus and then a ratio between the IDs of each imaged pair of nuclei was obtained. Finally, the average ID ratio (IDr) of at least 15 pairs of nuclei was calculated. The relative CENP-A loading efficiency of a depleted extract ( $\Delta$ ) with respect to a mock-depleted, control extract (C) is calculated as  $(\text{IDr}_{\Delta} - 1)/(\text{IDr}_C - 1)$ . In this case, we imaged together and quantified the CENP-A signals of nuclei assembled in CSF and late interphase, corresponding to point “1” and “3” of Fig. 1 C, respectively. To measure CENP-A eviction, the average integrated density of CENP-A signals in chromosomes assembled in depleted CSF extracts (Fig. 6 C) or in late interphase nuclei (Fig. S5), a reference sample was prepared in undepleted interphase and CSF extract, respectively. The resulting values are expressed as a ratio relative to the average value obtained for the mock-depleted extract.

### Online supplemental material

Fig. S1 shows that CENP-A incorporation occurs at centromeres and is independent of ongoing DNA replication. Fig. S2 shows that xHJURP associates with CENP-A in the egg extract and that other known histone chaperones are not affected by CENP-A depletion. Fig. S3 shows that substoichiometric amounts of xHJURP can restore full CENP-A loading. Fig. S4 shows that condensin I and condensin II are targeted to chromosomes independently of each other. Fig. S5 shows that condensin prevents eviction of CENP-A also in interphase. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201005136/DC1>.

We are grateful to D. Turner and S. Dilworth for reagents. We are also indebted to members of the Chromosome Dynamics and DNA Replication groups of the CNIO, and in particular J. Méndez, for helpful discussions.

This research has been supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (grants BFU2007-66627 and CSD-Inesgen to A. Losada; a Juan de la Cierva contract for R. Bernad; and FPI fellowships to P. Sánchez and T. Rivera); the European Commission Epigenome Network of Excellence (LSHG-CT-2004-503433) to G. Almouzni and A. Losada; MIRG-31126 to A. Losada; and EMBO fellowship ALTF 77-2007 for R. Bernad. Further support for the group of G. Almouzni comes from La Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée Ligue 2010); PIC Programs (“Retinoblastome” and “Replication, Instabilité chromosomique et cancer”); European Commission ITN FP7-PEOPLE-2007

“Image DDR” and FP7-PEOPLE-2008 “Nucleosome 4D”; ACI-2007-Cancéropôle IdF “Breast cancer and Epigenetics”; ANR “FaRC” PCV06\_142302 and ANR “ECenS” ANR-09-BLAN-0257-01; and INCa “GepiG”.

Submitted: 25 May 2010

Accepted: 20 January 2011

## References

- Ahmad, K., and S. Henikoff. 2001. Centromeres are specialized replication domains in heterochromatin. *J. Cell Biol.* 153:101–110. doi:10.1083/jcb.153.1.101
- Allshire, R.C., and G.H. Karpen. 2008. Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat. Rev. Genet.* 9:923–937. doi:10.1038/nrg2466
- Bernad, R., P. Sánchez, and A. Losada. 2009. Epigenetic specification of centromeres by CENP-A. *Exp. Cell Res.* 315:3233–3241. doi:10.1016/j.yexcr.2009.07.023
- Bloom, K. 2007. Centromere dynamics. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17:151–156. doi:10.1016/j.gde.2007.02.009
- Blower, M.D., B.A. Sullivan, and G.H. Karpen. 2002. Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Dev. Cell.* 2:319–330. doi:10.1016/S1534-5807(02)00135-1
- Camahort, R., B. Li, L. Florens, S.K. Swanson, M.P. Washburn, and J.L. Gerton. 2007. Scm3 is essential to recruit the histone h3 variant cse4 to centromeres and to maintain a functional kinetochore. *Mol. Cell.* 26:853–865. doi:10.1016/j.molcel.2007.05.013
- Camahort, R., M. Shivaraju, M. Mattingly, B. Li, S. Nakanishi, D. Zhu, A. Shilatifard, J.L. Workman, and J.L. Gerton. 2009. Cse4 is part of an octameric nucleosome in budding yeast. *Mol. Cell.* 35:794–805. doi:10.1016/j.molcel.2009.07.022
- Carroll, C.W., M.C. Silva, K.M. Godek, L.E. Jansen, and A.F. Straight. 2009. Centromere assembly requires the direct recognition of CENP-A nucleosomes by CENP-N. *Nat. Cell Biol.* 11:896–902. doi:10.1038/ncb1899
- Carroll, C.W., K.J. Milks, and A.F. Straight. 2010. Dual recognition of CENP-A nucleosomes is required for centromere assembly. *J. Cell Biol.* 189:1143–1155. doi:10.1083/jcb.201001013
- Clarke, L., H. Amstutz, B. Fishel, and J. Carbon. 1986. Analysis of centromeric DNA in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:8253–8257. doi:10.1073/pnas.83.21.8253
- Cleveland, D.W., Y. Mao, and K.F. Sullivan. 2003. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell.* 112:407–421. doi:10.1016/S0092-8674(03)00115-6
- Collins, K.A., S. Furuyama, and S. Biggins. 2004. Proteolysis contributes to the exclusive centromere localization of the yeast Cse4/CENP-A histone H3 variant. *Curr. Biol.* 14:1968–1972. doi:10.1016/j.cub.2004.10.024
- Conde e Silva, N., B.E. Black, A. Sivolob, J. Filipski, D.W. Cleveland, and A. Prunell. 2007. CENP-A-containing nucleosomes: easier disassembly versus exclusive centromeric localization. *J. Mol. Biol.* 370:555–573. doi:10.1016/j.jmb.2007.04.064
- De Koning, L., A. Corpet, J.E. Haber, and G. Almouzni. 2007. Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14:997–1007. doi:10.1038/nsmb1318
- Dilworth, S.M., S.J. Black, and R.A. Laskey. 1987. Two complexes that contain histones are required for nucleosome assembly in vitro: role of nucleoplasmin and N1 in *Xenopus* egg extracts. *Cell.* 51:1009–1018. doi:10.1016/0092-8674(87)90587-3
- Dunleavy, E.M., D. Roche, H. Tagami, N. Lacoste, D. Ray-Gallet, Y. Nakamura, Y. Daigo, Y. Nakatani, and G. Almouzni-Pettinotti. 2009. HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell.* 137:485–497. doi:10.1016/j.cell.2009.02.040
- Elsaesser, S.J., A.D. Goldberg, and C.D. Allis. 2010. New functions for an old variant: no substitute for histone H3.3. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20:110–117. doi:10.1016/j.gde.2010.01.003
- Erhardt, S., B.G. Mellone, C.M. Betts, W. Zhang, G.H. Karpen, and A.F. Straight. 2008. Genome-wide analysis reveals a cell cycle-dependent mechanism controlling centromere propagation. *J. Cell Biol.* 183:805–818. doi:10.1083/jcb.200806038
- Foltz, D.R., L.E. Jansen, B.E. Black, A.O. Bailey, J.R. Yates III, and D.W. Cleveland. 2006. The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nat. Cell Biol.* 8:458–469. doi:10.1038/ncb1397
- Foltz, D.R., L.E. Jansen, A.O. Bailey, J.R. Yates III, E.A. Bassett, S. Wood, B.E. Black, and D.W. Cleveland. 2009. Centromere-specific assembly of CENP-A nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell.* 137:472–484. doi:10.1016/j.cell.2009.02.039
- Fujita, Y., T. Hayashi, T. Kiyomitsu, Y. Toyoda, A. Kokubu, C. Obuse, and M. Yanagida. 2007. Priming of centromere for CENP-A recruitment by human hMis18alpha, hMis18beta, and M18BP1. *Dev. Cell.* 12:17–30. doi:10.1016/j.devcel.2006.11.002

- Furuyama, S., and S. Biggins. 2007. Centromere identity is specified by a single centromeric nucleosome in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104:14706–14711. doi:10.1073/pnas.0706985104
- Furuyama, T., Y. Dalal, and S. Henikoff. 2006. Chaperone-mediated assembly of centromeric chromatin in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103:6172–6177. doi:10.1073/pnas.0601686103
- Hagstrom, K.A., V.F. Holmes, N.R. Cozzarelli, and B.J. Meyer. 2002. *C. elegans* condensin promotes mitotic chromosome architecture, centromere organization, and sister chromatid segregation during mitosis and meiosis. *Genes Dev.* 16:729–742. doi:10.1101/gad.968302
- Hayashi, T., Y. Fujita, O. Iwasaki, Y. Adachi, K. Takahashi, and M. Yanagida. 2004. Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres. *Cell*. 118:715–729. doi:10.1016/j.cell.2004.09.002
- Hemmerich, P., S. Weidtkamp-Peters, C. Hoischen, L. Schmiedeberg, I. Erliandri, and S. Diekmann. 2008. Dynamics of inner kinetochore assembly and maintenance in living cells. *J. Cell Biol.* 180:1101–1114. doi:10.1083/jcb.200710052
- Hirano, T. 2005. Condensins: organizing and segregating the genome. *Curr. Biol.* 15:R265–R275. doi:10.1016/j.cub.2005.03.037
- Hori, T., M. Amano, A. Suzuki, C.B. Backer, J.P. Welburn, Y. Dong, B.F. McEwen, W.H. Shang, E. Suzuki, K. Okawa, et al. 2008. CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore. *Cell*. 135:1039–1052. doi:10.1016/j.cell.2008.10.019
- Izuta, H., M. Ikeno, N. Suzuki, T. Tomonaga, N. Nozaki, C. Obuse, Y. Kisu, N. Goshima, F. Nomura, N. Nomura, and K. Yoda. 2006. Comprehensive analysis of the ICEN (Interphase Centromere Complex) components enriched in the CENP-A chromatin of human cells. *Genes Cells*. 11:673–684. doi:10.1111/j.1365-2443.2006.00969.x
- Jäger, H., M. Rauch, and S. Heidmann. 2005. The *Drosophila melanogaster* condensin subunit Cap-G interacts with the centromere-specific histone H3 variant CID. *Chromosoma*. 113:350–361. doi:10.1007/s00412-004-0322-4
- Jansen, L.E., B.E. Black, D.R. Foltz, and D.W. Cleveland. 2007. Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *J. Cell Biol.* 176:795–805. doi:10.1083/jcb.200701066
- Lermontova, I., J. Fuchs, V. Schubert, and I. Schubert. 2007. Loading time of the centromeric histone H3 variant differs between plants and animals. *Chromosoma*. 116:507–510. doi:10.1007/s00412-007-0122-8
- Losada, A., M. Hirano, and T. Hirano. 1998. Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev.* 12:1986–1997. doi:10.1101/gad.12.13.1986
- Malik, H.S., and S. Henikoff. 2003. Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Biol.* 10:882–891. doi:10.1038/nsb996
- Marshall, O.J., A.T. Marshall, and K.H. Choo. 2008. Three-dimensional localization of CENP-A suggests a complex higher order structure of centromeric chromatin. *J. Cell Biol.* 183:1193–1202. doi:10.1083/jcb.200804078
- Milks, K.J., B. Moree, and A.F. Straight. 2009. Dissection of CENP-C-directed centromere and kinetochore assembly. *Mol. Biol. Cell*. 20:4246–4255. doi:10.1091/mbc.E09-05-0378
- Mizuguchi, G., H. Xiao, J. Wisniewski, M.M. Smith, and C. Wu. 2007. Nonhistone Scm3 and histones CenH3-H4 assemble the core of centromere-specific nucleosomes. *Cell*. 129:1153–1164. doi:10.1016/j.cell.2007.04.026
- Moreno-Moreno, O., M. Torras-Llort, and F. Azorín. 2006. Proteolysis restricts localization of CID, the centromere-specific histone H3 variant of *Drosophila*, to centromeres. *Nucleic Acids Res.* 34:6247–6255. doi:10.1093/nar/gkl902
- Musacchio, A., and E.D. Salmon. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:379–393. doi:10.1038/nrm2163
- Obuse, C., H. Yang, N. Nozaki, S. Goto, T. Okazaki, and K. Yoda. 2004. Proteomics analysis of the centromere complex from HeLa interphase cells: UV-damaged DNA binding protein 1 (DDB-1) is a component of the CEN-complex, while BMI-1 is transiently co-localized with the centromeric region in interphase. *Genes Cells*. 9:105–120. doi:10.1111/j.1365-2443.2004.00705.x
- Okada, M., I.M. Cheeseman, T. Hori, K. Okawa, I.X. McLeod, J.R. Yates III, A. Desai, and T. Fukagawa. 2006. The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres. *Nat. Cell Biol.* 8:446–457. doi:10.1038/ncb1396
- Okada, M., K. Okawa, T. Isobe, and T. Fukagawa. 2009. CENP-H-containing complex facilitates centromere deposition of CENP-A in cooperation with FACT and CHD1. *Mol. Biol. Cell*. 20:3986–3995. doi:10.1091/mbc.E09-01-0065
- Oliveira, R.A., P.A. Coelho, and C.E. Sunkel. 2005. The condensin I subunit Barren/CAP-H is essential for the structural integrity of centromeric heterochromatin during mitosis. *Mol. Cell Biol.* 25:8971–8984. doi:10.1128/MCB.25.20.8971-8984.2005
- Ono, T., A. Losada, M. Hirano, M.P. Myers, A.F. Neuwald, and T. Hirano. 2003. Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. *Cell*. 115:109–121. doi:10.1016/S0092-8674(03)00724-4
- Ono, T., Y. Fang, D.L. Spector, and T. Hirano. 2004. Spatial and temporal regulation of Condensins I and II in mitotic chromosome assembly in human cells. *Mol. Biol. Cell*. 15:3296–3308. doi:10.1091/mbc.E04-03-0242
- Pearson, C.G., P.S. Maddox, E.D. Salmon, and K. Bloom. 2001. Budding yeast chromosome structure and dynamics during mitosis. *J. Cell Biol.* 152:1255–1266. doi:10.1083/jcb.152.6.1255
- Perpelescu, M., N. Nozaki, C. Obuse, H. Yang, and K. Yoda. 2009. Active establishment of centromeric CENP-A chromatin by RSF complex. *J. Cell Biol.* 185:397–407. doi:10.1083/jcb.200903088
- Pidoux, A.L., E.S. Choi, J.K. Abbott, X. Liu, A. Kagansky, A.G. Castillo, G.L. Hamilton, W. Richardson, J. Rappsilber, X. He, and R.C. Allshire. 2009. Fission yeast Scm3: A CENP-A receptor required for integrity of subkinetochore chromatin. *Mol. Cell*. 33:299–311. doi:10.1016/j.molcel.2009.01.019
- Quivy, J.P., P. Grandi, and G. Almouzni. 2001. Dimerization of the largest subunit of chromatin assembly factor I: importance in vitro and during *Xenopus* early development. *EMBO J.* 20:2015–2027. doi:10.1093/emboj/20.8.2015
- Ray-Gallet, D., J.P. Quivy, C. Scamps, E.M. Martini, M. Lipinski, and G. Almouzni. 2002. HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol. Cell*. 9:1091–1100. doi:10.1016/S1097-2765(02)00526-9
- Rivera, T., and A. Losada. 2009. Shugoshin regulates cohesion by driving re-localization of PP2A in *Xenopus* extracts. *Chromosoma*. 118:223–233. doi:10.1007/s00412-008-0190-4
- Samoshkin, A., A. Arnaoutov, L.E. Jansen, I. Ouspenski, L. Dye, T. Karpova, J. McNally, M. Dasso, D.W. Cleveland, and A. Strunnikov. 2009. Human condensin function is essential for centromeric chromatin assembly and proper sister kinetochore orientation. *PLoS ONE*. 4:e6831. doi:10.1371/journal.pone.0006831
- Sánchez-Pulido, L., A.L. Pidoux, C.P. Ponting, and R.C. Allshire. 2009. Common ancestry of the CENP-A chaperones Scm3 and HJURP. *Cell*. 137:1173–1174. doi:10.1016/j.cell.2009.06.010
- Santaguida, S., and A. Musacchio. 2009. The life and miracles of kinetochores. *EMBO J.* 28:2511–2531. doi:10.1038/emboj.2009.173
- Schuh, M., C.F. Lehner, and S. Heidmann. 2007. Incorporation of *Drosophila* CID/CENP-A and CENP-C into centromeres during early embryonic anaphase. *Curr. Biol.* 17:237–243. doi:10.1016/j.cub.2006.11.051
- Shelby, R.D., O. Vafa, and K.F. Sullivan. 1997. Assembly of CENP-A into centromeric chromatin requires a cooperative array of nucleosomal DNA contact sites. *J. Cell Biol.* 136:501–513. doi:10.1083/jcb.136.3.501
- Shelby, R.D., K. Monier, and K.F. Sullivan. 2000. Chromatin assembly at kinetochores is uncoupled from DNA replication. *J. Cell Biol.* 151:1113–1118. doi:10.1083/jcb.151.5.1113
- Shuaib, M., K. Ouararhni, S. Dimitrov, and A. Hamiche. 2010. HJURP binds CENP-A via a highly conserved N-terminal domain and mediates its deposition at centromeres. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107:1349–1354. doi:10.1073/pnas.0913709107
- Silva, M.C., and L.E. Jansen. 2009. At the right place at the right time: novel CENP-A binding proteins shed light on centromere assembly. *Chromosoma*. 118:567–574. doi:10.1007/s00412-009-0227-3
- Stoler, S., K. Rogers, S. Weitze, L. Morey, M. Fitzgerald-Hayes, and R.E. Baker. 2007. Scm3, an essential *Saccharomyces cerevisiae* centromere protein required for G2/M progression and Cse4 localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104:10571–10576. doi:10.1073/pnas.0703178104
- Tagami, H., D. Ray-Gallet, G. Almouzni, and Y. Nakatani. 2004. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell*. 116:51–61. doi:10.1016/S0092-8674(03)01064-X
- Takayama, Y., H. Sato, S. Saitoh, Y. Ogiyama, F. Masuda, and K. Takahashi. 2008. Biphasic incorporation of centromeric histone CENP-A in fission yeast. *Mol. Biol. Cell*. 19:682–690. doi:10.1091/mbc.E07-05-0504
- Torras-Llort, M., O. Moreno-Moreno, and F. Azorín. 2009. Focus on the centre: the role of chromatin on the regulation of centromere identity and function. *EMBO J.* 28:2337–2348. doi:10.1038/emboj.2009.174
- Wignall, S.M., R. Deehan, T.J. Maresca, and R. Heald. 2003. The condensin complex is required for proper spindle assembly and chromosome segregation in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Biol.* 161:1041–1051. doi:10.1083/jcb.200303185
- Williams, J.S., T. Hayashi, M. Yanagida, and P. Russell. 2009. Fission yeast Scm3 mediates stable assembly of Cnp1/CENP-A into centromeric chromatin. *Mol. Cell*. 33:287–298. doi:10.1016/j.molcel.2009.01.017
- Yong-Gonzalez, V., B.D. Wang, P. Butylin, I. Ouspenski, and A. Strunnikov. 2007. Condensin function at centromere chromatin facilitates proper kinetochore tension and ensures correct mitotic segregation of sister chromatids. *Genes Cells*. 12:1075–1090. doi:10.1111/j.1365-2443.2007.01109.x
- Zeitlin, S.G., N.M. Baker, B.R. Chapados, E. Soutoglou, J.Y. Wang, M.W. Berns, and D.W. Cleveland. 2009. Double-strand DNA breaks recruit the centromeric histone CENP-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106:15762–15767. doi:10.1073/pnas.0908233106

COMMENTARY

Open Access

# New clues to understand how CENP-A maintains centromere identity

Patricia Sánchez and Ana Losada\*

## Abstract

The centromere is a specialized chromosomal region that directs the formation of the kinetochore, a huge protein assembly that acts as the attachment site for spindle microtubules and carries out chromosome movement during cell division. Centromere loss or the presence of extra centromeres adversely affect chromosome segregation and may result in aneuploidy, a condition found in many human tumors and a major cause of miscarriages and birth defects. Consequently, understanding the basis of centromere determination and propagation is of great relevance to both fundamental and clinical research. In recent years, it has become clear that centromeres are defined by the presence of a histone H3 variant known as Centromere Protein A, CENP-A, or CenH3. Much effort has been devoted to understanding the mechanisms that drive the assembly of CENP-A containing nucleosomes exclusively onto centromeric DNA, as well as the peculiar structure of these nucleosomes. We have recently developed an immunofluorescence-based assay that measures CENP-A incorporation in the centromeres of chromosomes assembled in *Xenopus* egg extracts. The spatial and temporal specificity of CENP-A deposition observed in human cells can be recapitulated in this in vitro system, making it suitable to dissect the precise role of the different factors that contribute to this pathway. Here, we discuss our results together with other recent advances in our understanding of the mechanisms that mediate centromere inheritance.

## Introduction

Active centromeres are defined by the presence of nucleosomes containing a unique histone H3 variant known as CENP-A [1,2]. Stretched centromeric chromatin from *Drosophila*, human and chicken DT40 cells shows the presence of interspersed blocks of CENP-A and canonical H3 nucleosomes [3,4]. This chromatin fiber must then be folded to adopt the appropriate compact conformation over which the kinetochore is assembled [5,6]. In proliferating cells, the amount of CENP-A present at centromeres has to be replenished at the time or after centromeric DNA is duplicated in order to propagate centromere identity. The mechanisms responsible for *de novo* CENP-A deposition specifically at centromeres and their regulation in the cell cycle have been an active field of research over the last years. Despite the lack of conservation of centromeric DNA sequences and of the timing of CENP-A nucleosome assembly among different organisms, there is a remarkable conservation of the major players involved in

centromere propagation. Thus, research in different experimental systems greatly contributes to put the big picture in focus.

## Discussion

### Mechanisms of CENP-A incorporation mediated by HJURP

One central question of centromere biology is how is CENP-A deposited at centromeric chromatin. Members of a protein family named Scm3/HJURP (Holliday Junction Recognizing Protein), conserved from yeast to humans, have been proposed to act as CENP-A specific chaperones in yeast and human cells [7-15]. These proteins interact physically with CENP-A, can be found at centromeres and, most importantly, are required for CENP-A loading and maintenance. Many additional factors play a role in CENP-A incorporation, but how it actually happens remains unclear. To address this issue, we developed an assay to measure CENP-A incorporation using the *Xenopus* egg cell-free system [16]. In this immunofluorescence-based assay, nuclei assembled from sperm chromatin and taken at two different time points (e.g. mitosis and subsequent interphase) are combined and processed for immunofluorescence with a CENP-A specific antibody, imaged

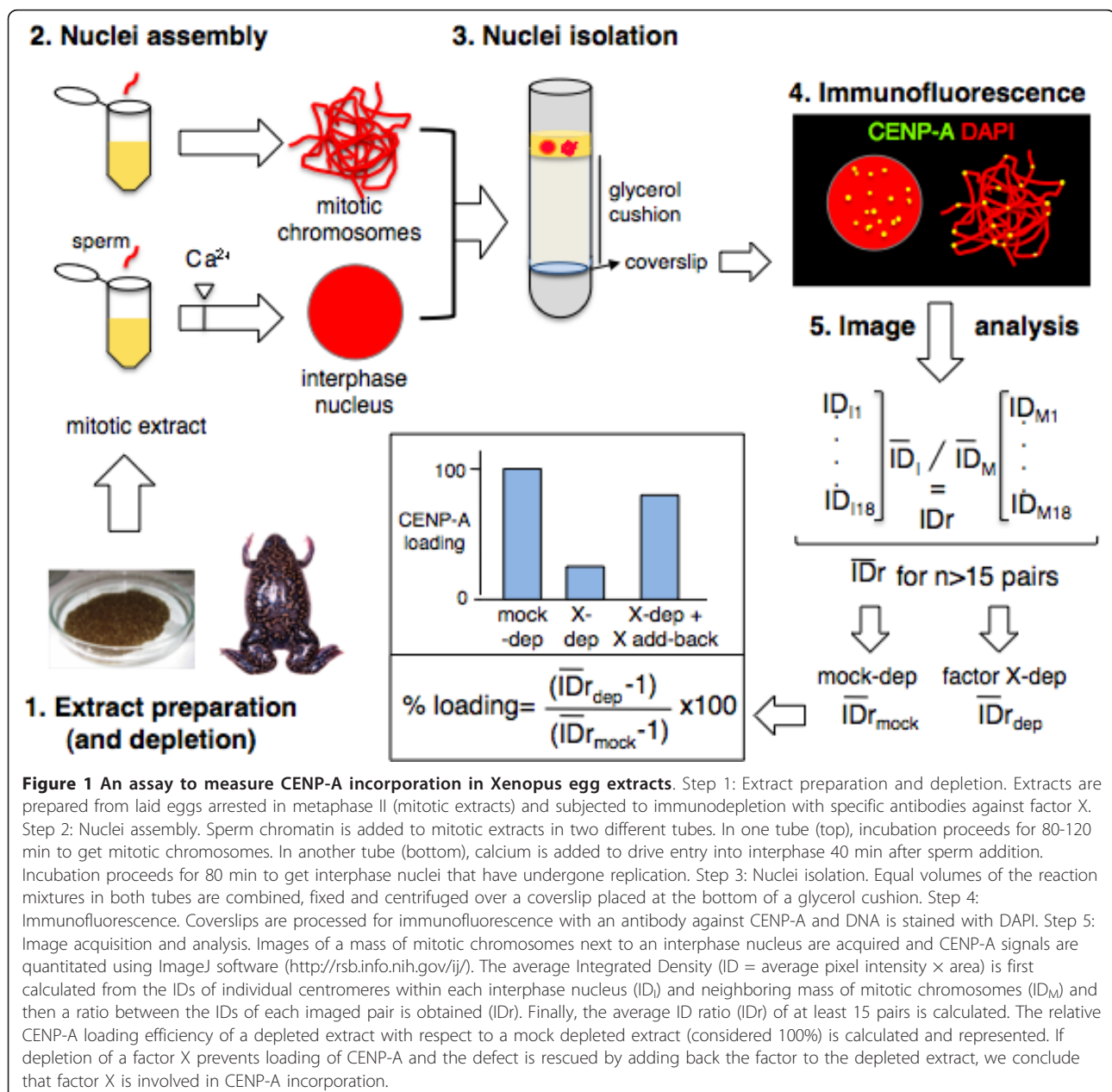
\* Correspondence: [alosada@cniio.es](mailto:alosada@cniio.es)  
Chromosome Dynamics Group, Molecular Oncology Programme, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Melchor Fernández Almagro 3, Madrid, E-28029, Spain



together, and the centromeric CENP-A signals measured to assess the average difference in intensity between the centromeres within each pair (see Figure 1). We first showed that, in the egg extracts, CENP-A incorporation occurs upon exit from mitosis but independently of DNA replication, same as in *Drosophila* embryos and human cells [17-20]. Specific immunodepletion of proteins involved in the deposition of other histone H3 variants (CAF-1 and HIRA [21]), did not affect significantly the incorporation of CENP-A. In contrast, we found that CENP-A deposition depends on *Xenopus* HJURP (xHJURP) and that human HJURP can replace xHJURP.

In fact, xHJURP is stored in the oocyte cytoplasm in association with CENP-A, which supports the idea that they form a pre-assembly complex. Analysis of the crystal structure of the CENP-A binding domain of Scm3 in complex with CENP-A and H4 reveals that the interaction of Scm3/HJURP with the CENP-A/H4 dimer is not compatible with binding to DNA further supporting that this is indeed a pre-assembly complex [22].

How HJURP works is still a mystery. It has been recently speculated that its action at centromeres could be coupled to DNA repair [23] or to transcription [24]. In vitro, Scm3 can incorporate CENP-A-containing octamers into



plasmid DNA, but not octamers bearing canonical H3 [25]. This probably reflects the fact that the CENP-A targeting domain (CATD), comprised of loop1 and helix 2 of the histone fold domain, not present in H3, is required for the interaction with Scm3/HJURP [14,26]. Importantly, the histone chaperone Nap1 can also do the job (this time for both CENP-A and H3-containing octamers), as it was previously shown for RbAp48 [27]. On the other hand, it is unclear what kind of nucleosomes Scm3/HJURP deposits onto DNA. In one study, nucleosome assembly was not observed upon incubation of Smc3/CENP-A/H4 with plasmid DNA unless H2A/H2B dimers were included in the mixture [25]. However, another group had previously achieved nucleosome reconstitution with this complex and linear lambda DNA [28] and evidence for CENP-A/H4 tetramer deposition on a plasmid template has also been reported for human HJURP [15]. Further studies will be required to explain these controversial results as well as the exact composition of CENP-A nucleosomes *in vivo* (tetrasome, hexasomes, octamers?) and whether they wrap DNA in the conventional left-handed manner or the opposite (for a recent review on these matters, see [29]).

#### **The role of condensin II in CENP-A deposition and maintenance**

Consistent with similar results in human cells, we observed that efficient CENP-A loading during interphase requires previous passage through mitosis [19]. We reasoned that maybe folding of centromeric chromatin during mitosis could be essential for subsequent CENP-A deposition. We thus decided to investigate whether condensin, a major mediator of chromosome condensation, had any role in CENP-A assembly, as suggested by a study in human cells [30]. There are two distinct condensin complexes in most organisms, condensin I and condensin II, which share the SMC2/SMC4 heterodimer but have distinct regulatory subunits. In *Xenopus* egg extracts, condensin I is five fold more abundant than condensin II and its role in the assembly of mitotic chromosomes is clearly predominant [31]. However, condensin II accumulates at centromeres suggesting a specific function at this region. Indeed, we found that condensin II has two functions regarding CENP-A assembly. One, it stabilizes CENP-A nucleosomes preventing their eviction. Two, it allows efficient CENP-A incorporation. None of these functions are compensated by the presence of condensin I in extracts lacking condensin II.

The first function refers to the observation that a fraction of CENP-A nucleosomes are lost from centromeres in the absence of condensin II. Easier disassembly of CENP-A nucleosomes compared with canonical H3 nucleosomes could facilitate the clearance of those erroneously incorporated outside of centromeres [32,33] and would be counterbalanced by some property of

centromeric chromatin, presumably related to the presence of condensin II in this region. Importantly, this stabilization of CENP-A nucleosomes happens both in mitosis and in interphase.

Regarding the second function, we first suspected that the folding imposed by condensin II could contribute to the recognition of this region by HJURP. However, we did not observe changes in the localization of HJURP in the condensin II depleted extracts. Alternatively, targeting or function of some of the proteins acting downstream of HJURP to effectively incorporate CENP-A might require condensin II. Among those proteins could be remodeling complexes like FACT, RSF1 or CHD1 [34,35] or some of the components of the constitutive centromere-associated network (CCAN) [36,37]. Within this group of inner centromere proteins, CENP-C seems particularly important. On one hand, CENP-C has been proposed to connect CENP-A nucleosomes with CCAN components such as CENP-N [38]. On the other, it links CCAN and the Knl1-Mis12-Ndc80 complex (KMN) network of the outer kinetochore [39-41]. Maybe as a consequence, CENP-C is required to stabilize the folded conformation of the mitotic centromere/kinetochore complex [4]. Since the KMN network, in addition to interacting with microtubules, recruits spindle assembly checkpoint proteins, loss of CENP-C results in multiple, adverse consequences for centromere architecture and function [39,42]. Under this condition, decreased incorporation of CENP-A observed in CENP-C knock down cells could be a secondary effect [38]. In this regard, one important advantage of our *in vitro* assay for CENP-A incorporation in *Xenopus* egg extracts is that one can analyze the effect of eliminating one specific factor after a single round of CENP-A loading without accumulation of errors from previous rounds or alteration of cell cycle progression. Thus, it will be important to investigate the functional relationship between CENP-C and condensin II in this experimental system.

#### **How is CENP-A ectopic localization prevented?**

Regulation of CENP-A transcription also contributes to specify CENP-A incorporation at centromeres. In human cells, mRNA levels of CENP-A are low during G1 and S phase and increase during G2, prior to its incorporation at the end of the next mitosis [17]. When CENP-A is overexpressed in yeast and *Drosophila* cells, it incorporates throughout the chromatin [33,43]. However, proteasome-mediated degradation leads to elimination of this mislocalized CENP-A ensuring its exclusive presence at centromeres. Last year, two studies identified an E3 ubiquitin ligase, Psh1, that specifically targets CENP-A in budding yeast [44,45]. Deletion of Psh1 increases CENP-A stability and causes its accumulation at euchromatic regions, but only if CENP-A is highly overexpressed. Like Scm3/HJURP, Psh1 recognizes the



CATD of CENP-A. Thus, it is likely that binding of CENP-A to Scm3 at centromeres protects CENP-A from the action of Psh1. Identification of a similar proteolytic regulation in higher eukaryotes remains to be described. In *Xenopus* egg extracts, protein complexes are stored in the oocyte cytoplasm so that the first twelve cycles following fertilization can happen with very little transcription. More than half of the soluble pool of CENP-A molecules in *Xenopus* egg extracts is bound to HJURP, which could be important to protect CENP-A from degradation. However, we also found that exogenous CENP-A added to these extracts is unable to compete with endogenous CENP-A for the binding of HJURP, but despite this, is stable [16]. Thus, the CENP-A degradation machinery is presumably not operative in the embryonic cycles.

In *Drosophila*, Cal1 was identified in a screening for regulators of the centromeric localization of CENP-A/Cid and CENP-C [46]. More recently, Schittenhelm *et al.* observed that the number of Cal1 molecules per centromere is much lower than CENP-A and CENP-C (2.5, 84 and 135 molecules, respectively) [47]. This, together with the observation that an increase in the centromeric signal of CENP-A is observed only if CENP-A is overexpressed along with Cal1 led the authors to propose that Cal1 restricts the deposition of CENP-A and CENP-C. Whether a similar mechanism exists in other organisms is unclear, since Cal1 orthologs have not been found outside *Drosophilids*.

## Outlook

Despite recent advances in our understanding of how centromere identity is propagated, in particular the identification of Scm3/HJURP, we are only beginning to elucidate the molecular mechanisms involved and their careful regulation in the cell cycle. Fundamental questions need to be addressed. Does HJURP mediate CENP-A nucleosome assembly by itself or does it require the concerted action of additional chromatin remodelers? What restricts HJURP localization spatially (to centromeres) and temporally (early G1 in the case of human cells)? What is the role of epigenetic marks present on centromeric chromatin? The status of histone acetylation regulated by the Mis18 complex [48] and the presence of H3dimethylK4 [24] have both been proposed to affect CENP-A deposition, presumably by directing HJURP to centromeres, but the exact means of this regulation remains obscure. And what about centromeric RNA transcripts? HJURP and CENP-C accumulate at the nucleolus in interphase, an organelle in which nucleoprotein complexes are assembled [13,49,50]. In fact, CENP-C associates with RNA transcripts derived from centromeric repeats, and these transcripts are required for its centromeric targeting [50,51]. Could HJURP have also an

RNA component? Solving these and other exciting questions mentioned throughout this commentary will keep researchers busy in the years ahead.

## Conclusions

Proper assembly of kinetochores at centromeres is essential for accurate chromosome segregation and thereby to ensure genome stability. Centromeres are determined epigenetically by the presence of the histone H3 variant, CENP-A. Several factors implicated in the deposition of this specialized histone have been identified, but the exact molecular mechanism of centromere inheritance remains unclear. We have recently developed an assay that measures CENP-A incorporation at centromeres of chromosomes assembled in *Xenopus* egg extracts and found that this in vitro system recapitulates the temporal restrictions observed in human cells, and that the major players involved, including HJURP, are highly conserved. We are therefore confident that this assay will be a useful tool to further dissect CENP-A deposition in molecular detail.

## Acknowledgements

Research in our lab is supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2007-66627 and associated FPI fellowship, SAF2010-21517; Consolider CSD2007-00015 and FEDER) and the European Commission (FP7-PEOPLE-2008 ITN "Nucleosome 4D").

## Authors' contributions

PS and AL wrote the manuscript together. Both authors read and approved the final manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 5 April 2011 Accepted: 9 May 2011 Published: 9 May 2011

## References

1. Allshire RC, Karpen GH: Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat Rev Genet* 2008, **9**:923-937.
2. Torras-Llort M, Moreno-Moreno O, Azorin F: Focus on the centre: the role of chromatin on the regulation of centromere identity and function. *Embo J* 2009, **28**:2337-2348.
3. Blower MD, Sullivan BA, Karpen GH: Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Dev Cell* 2002, **2**:319-330.
4. Ribeiro SA, Vagnarelli P, Dong Y, Hori T, McEwen BF, Fukagawa T, Flors C, Earnshaw WC: A super-resolution map of the vertebrate kinetochore. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, **107**:10484-10489.
5. Marshall OJ, Marshall AT, Choo KH: Three-dimensional localization of CENP-A suggests a complex higher order structure of centromeric chromatin. *J Cell Biol* 2008, **183**:1193-1202.
6. Santaguida S, Musacchio A: The life and miracles of kinetochores. *Embo J* 2009, **28**:2511-2531.
7. Camahort R, Li B, Florens L, Swanson SK, Washburn MP, Gerton JL: Scm3 is essential to recruit the histone h3 variant cse4 to centromeres and to maintain a functional kinetochore. *Mol Cell* 2007, **26**:853-865.
8. Mizuguchi G, Xiao H, Wisniewski J, Smith MM, Wu C: Nonhistone Scm3 and histones CenH3-H4 assemble the core of centromere-specific nucleosomes. *Cell* 2007, **129**:1153-1164.
9. Pidoux AL, Choi ES, Abbott JK, Liu X, Kagansky A, Castillo AG, Hamilton GL, Richardson W, Rappsilber J, He X, Allshire RC: Fission yeast Scm3: A CENP-A receptor required for integrity of subkinetochore chromatin. *Mol Cell* 2009, **33**:299-311.

10. Sánchez-Pulido L, Pidoux AL, CP P, Allshire RC: **Common ancestry of the CENP-A chaperones Scm3 and HJURP.** *Cell* 2009, **137**:1173-1174.
11. Stoler S, Rogers K, Weitze S, Morey L, Fitzgerald-Hayes M, Baker RE: **Scm3, an essential *Saccharomyces cerevisiae* centromere protein required for G2/M progression and Cse4 localization.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:10571-10576.
12. Williams JS, Hayashi T, Yanagida M, Russell P: **Fission yeast Scm3 mediates stable assembly of Cnp1/CENP-A into centromeric chromatin.** *Mol Cell* 2009, **33**:287-298.
13. Dunleavy EM, Roche D, Tagami H, Lacoste N, Ray-Gallet D, Nakamura Y, Daigo Y, Nakatani Y, Almouzni-Pettinotti G: **HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres.** *Cell* 2009, **137**:485-497.
14. Foltz DR, Jansen LE, Bailey AO, Yates JR, Bassett EA, Wood S, Black BE, Cleveland DW: **Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP.** *Cell* 2009, **137**:472-484.
15. Shuaib M, Ouararhni K, Dimitrov S, Hamiche A: **HJURP binds CENP-A via a highly conserved N-terminal domain and mediates its deposition at centromeres.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, **107**:1349-1354.
16. Bernad R, Sanchez P, Rivera T, Rodriguez-Corsino M, Boyarchuk E, Vassias I, Ray-Gallet D, Arnaoutov A, Dasso M, Almouzni G, Losada A: **Xenopus HJURP and condensin II are required for CENP-A assembly.** *J Cell Biol* 2011, **192**:569-582.
17. Shelby RD, Monier K, Sullivan KF: **Chromatin assembly at kinetochores is uncoupled from DNA replication.** *J Cell Biol* 2000, **151**:1113-1118.
18. Schuh M, Lehner CF, Heidmann S: **Incorporation of *Drosophila* CID/CENP-A and CENP-C into centromeres during early embryonic anaphase.** *Curr Biol* 2007, **17**:237-243.
19. Jansen LE, Black BE, Foltz DR, Cleveland DW: **Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis.** *J Cell Biol* 2007, **176**:795-805.
20. Hemmerich P, Weidtkamp-Peters S, Hoischen C, Schmiedeberg L, Eriandri I, Diekmann S: **Dynamics of inner kinetochore assembly and maintenance in living cells.** *J Cell Biol* 2008, **180**:1101-1114.
21. Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y: **Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis.** *Cell* 2004, **116**:51-61.
22. Zhou Z, Feng H, Zhou BR, Ghirlando R, Hu K, Zwolak A, Miller Jenkins LM, Xiao H, Tjandra N, Wu C, Bai Y: **Structural basis for recognition of centromere histone variant CenH3 by the chaperone Scm3.** *Nature* 2011, **472**:234-237.
23. Zeitlin SG, Chapados BR, Baker NM, Tai C, Slupphaug G, Wang JY: **Uracil DNA N-glycosylase promotes assembly of human centromere protein a.** *PLoS ONE* 2011, **6**:e17151.
24. Bergmann JH, Rodriguez MG, Martins NM, Kimura H, Kelly DA, Masumoto H, Larionov V, Jansen LE, Earnshaw WC: **Epigenetic engineering shows H3K4me2 is required for HJURP targeting and CENP-A assembly on a synthetic human kinetochore.** *Embo J* 2010, **30**:328-340.
25. Shivaraju M, Camahort R, Mattingly M, Gerton JL: **Scm3 is a centromeric nucleosome assembly factor.** *J Biol Chem* 2011, **286**:12016-12023.
26. Black BE, Foltz DR, Chakravarthy S, Luger K, Woods VL Jr, Cleveland DW: **Structural determinants for generating centromeric chromatin.** *Nature* 2004, **430**:578-582.
27. Furuyama T, Dalal Y, Henikoff S: **Chaperone-mediated assembly of centromeric chromatin in vitro.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:6172-6177.
28. Visnapuu ML, Greene EC: **Single-molecule imaging of DNA curtains reveals intrinsic energy landscapes for nucleosome deposition.** *Nat Struct Mol Biol* 2009, **16**:1056-1062.
29. Black BE, Cleveland DW: **Epigenetic centromere propagation and the nature of CENP-A nucleosomes.** *Cell* 2011, **144**:471-479.
30. Samoshkin A, Arnaoutov A, Jansen LE, Ouspenski I, Dye L, Karpova T, McNally J, Dasso M, Cleveland DW, Strunnikov A: **Human condensin function is essential for centromeric chromatin assembly and proper sister kinetochore orientation.** *PLoS ONE* 2009, **4**:e6831.
31. Ono T, Losada A, Hirano M, Myers MP, Neuwald AF, Hirano T: **Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells.** *Cell* 2003, **115**:109-121.
32. Conde e Silva N, Black BE, Sivolob A, Filipski J, Cleveland DW, Prunell A: **CENP-A-containing nucleosomes: easier disassembly versus exclusive centromeric localization.** *J Mol Biol* 2007, **370**:555-573.
33. Moreno-Moreno O, Torras-Llort M, Azorin F: **Proteolysis restricts localization of CID, the centromere-specific histone H3 variant of *Drosophila*, to centromeres.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**:6247-6255.
34. Perpelescu M, Nozaki N, Obuse C, Yang H, Yoda K: **Active establishment of centromeric CENP-A chromatin by RSF complex.** *J Cell Biol* 2009, **185**:397-407.
35. Okada M, Okawa K, Isobe T, Fukagawa T: **CENP-H-containing Complex Facilitates Centromere Deposition of CENP-a in Cooperation with FACT and CHD1.** *Mol Biol Cell* 2009, **20**:3986-3995.
36. Okada M, Cheeseman IM, Hori T, Okawa K, McLeod IX, Yates JR, Desai A, Fukagawa T: **The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres.** *Nat Cell Biol* 2006, **8**:446-457.
37. Hori T, Amano M, Suzuki A, Backer CB, Welburn JP, Dong Y, McEwen BF, Shang WH, Suzuki E, Okawa K, et al: **CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore.** *Cell* 2008, **135**:1039-1052.
38. Carroll CW, Milks KJ, Straight AF: **Dual recognition of CENP-A nucleosomes is required for centromere assembly.** *J Cell Biol* 2010, **189**:1143-1155.
39. Screpanti E, De Antoni A, Alushin GM, Petrovic A, Melis T, Nogales E, Musacchio A: **Direct binding of cenp-C to the mis12 complex joins the inner and outer kinetochore.** *Curr Biol* 2011, **21**:391-398.
40. Milks KJ, Moree B, Straight AF: **Dissection of CENP-C-directed centromere and kinetochore assembly.** *Mol Biol Cell* 2009, **20**:4246-4255.
41. Przewlaka MR, Venkei Z, Bolanos-Garcia VM, Debski J, Dadlez M, Glover DM: **CENP-C Is a Structural Platform for Kinetochore Assembly.** *Curr Biol* 2011, **21**:399-405.
42. Orr B, Sunkel CE: ***Drosophila* CENP-C is essential for centromere identity.** *Chromosoma* 2011, **120**:83-96.
43. Collins KA, Camahort R, Seidel C, Gerton JL, Biggins S: **The overexpression of a *Saccharomyces cerevisiae* centromeric histone H3 variant mutant protein leads to a defect in kinetochore biorientation.** *Genetics* 2007, **175**:513-525.
44. Hewawasam G, Shivaraju M, Mattingly M, Venkatesh S, Martin-Brown S, Florens L, Workman JL, Gerton JL: **Psh1 is an E3 ubiquitin ligase that targets the centromeric histone variant Cse4.** *Mol Cell* 2010, **40**:444-454.
45. Ranjitkar P, Press MO, Yi X, Baker R, MacCoss MJ, Biggins S: **An E3 ubiquitin ligase prevents ectopic localization of the centromeric histone H3 variant via the centromere targeting domain.** *Mol Cell* 2010, **40**:455-464.
46. Erhardt S, Mellone BG, Betts CM, Zhang W, Karpen GH, Straight AF: **Genome-wide analysis reveals a cell cycle-dependent mechanism controlling centromere propagation.** *J Cell Biol* 2008, **183**:805-818.
47. Schittenhelm RB, Althoff F, Heidmann S, Lehner CF: **Detrimental incorporation of excess Cenp-A/Cid and Cenp-C into *Drosophila* centromeres is prevented by limiting amounts of the bridging factor Cal1.** *J Cell Sci* 2010, **123**:3768-3779.
48. Fujita Y, Hayashi T, Kiyomitsu T, Toyoda Y, Kokubu A, Obuse C, Yanagida M: **Priming of centromere for CENP-A recruitment by human hMis18alpha, hMis18beta, and M18BP1.** *Dev Cell* 2007, **12**:17-30.
49. Kato T, Sato N, Hayama S, Yamabuki T, Ito T, Miyamoto M, Kondo S, Nakamura Y, Daigo Y: **Activation of Holliday junction recognizing protein involved in the chromosomal stability and immortality of cancer cells.** *Cancer Res* 2007, **67**:8544-8553.
50. Wong LH, Brettingham-Moore KH, Chan L, Quach JM, Anderson MA, Northrop EL, Hannan R, Saffery R, Shaw ML, Williams E, Choo KH: **Centromere RNA is a key component for the assembly of nucleoproteins at the nucleolus and centromere.** *Genome Res* 2007, **17**:1146-1160.
51. Du Y, Topp CN, Dawe RK: **DNA binding of centromere protein C (CENPC) is stabilized by single-stranded RNA.** *PLoS Genet* 2011, **6**:e1000835.

doi:10.1186/1747-1028-6-11

**Cite this article as:** Sánchez and Losada: New clues to understand how CENP-A maintains centromere identity. *Cell Division* 2011 **6**:11.